

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PTO/PCT Rec'd 14 AUG 2000
PCT

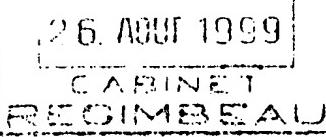
AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année)
19 août 1999 (19.08.99)Référence du dossier du déposant ou du mandataire
339686/16955

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Demande internationale no	Date du dépôt international (jour/mois/année)	Date de priorité (jour/mois/année)
PCT/FR99/00316	12 février 1999 (12.02.99)	13 février 1998 (13.02.98)

Déposant
CHAMPAGNE MOET & CHANDON etc

AVIS IMPORTANT

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,
ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,
SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZW
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).
3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 19 août 1999 (19.08.99) sous le numéro WO 99/41392

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télecopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

Suite du formulaire PCT/IB/308
AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 août 1999 (19.08.99)	AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339686/16955	Demande internationale no PCT/FR99/00316

Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(54) Title: NUCLEIC ACID COMPRISING THE SEQUENCE OF A PROMOTER INDUCTIBLE BY STRESS AND A GENE SEQUENCE CODING FOR A STILBENE SYNTHASE

(54) Titre: ACIDE NUCLEIQUE COMPRENNANT LA SEQUENCE D'UN PROMOTEUR INDUCTIBLE PAR UN STRESS ET UNE SEQUENCE D'UN GENE CODANT POUR UNE STILBENE SYNTHASE

(57) Abstract

The invention concerns plants with improved resistance to certain stilbene-sensitive pathogenic agents, and more particularly a set of constructs combining a plant promoter inducible by biotic stress, generated in particular by said pathogens, and gene(s) coding for a stilbene synthase.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des plantes présentant des résistances améliorées à certains agents pathogènes sensibles aux stilbènes, et concerne plus particulièrement un ensemble de constructions associant un promoteur végétal inducible par un stress biotique, engendré notamment par lesdits pathogènes, à un ou des gène(s) codant pour une stilbène synthase.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	VN	Viet Nam
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande		
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

534 Rec'd PCT/PTO 14 AUG 2000

ACIDE NUCLEIQUE COMPRENANT LA SEQUENCE D'UN PROMOTEUR INDUCTIBLE PAR UN STRESS ET UNE
SEQUENCE D'UN GENE CODANT POUR UNE STILBENE SYNTHASE

5 La présente invention concerne des plantes présentant des résistances améliorées à certains agents pathogènes sensibles aux stilbènes, et concerne plus particulièrement un ensemble de constructions associant un promoteur végétal inductible par un stress biotique,
10 engendré notamment par lesdits pathogènes, à un ou des gène(s) codant pour une stilbène synthase.

Une grande partie de la récolte mondiale de plantes cultivées est constamment détruite par les parasites et les pathogènes. Parmi les possibilités permettant de diminuer ou d'empêcher l'attaque des plantes cultivées par ces parasites, la lutte chimique (traitements phytosanitaires) est la méthode la plus utilisée. Néanmoins, l'application de produits chimiques n'est pas sans conséquence pour l'environnement et pose parfois des problèmes technologiques comme par exemple l'apparition de nouvelles souches pathogènes résistantes ou, dans le domaine de l'oenologie, les difficultés qui peuvent survenir au cours des fermentations (l'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols peut bloquer la croissance des levures en fin de fermentation) ou la présence de produits chimiques retrouvés parfois dans les vins comme la procymidone, produit anti-Botrytis.

Pour pallier les inconvénients liés à la lutte chimique, la méthode de lutte consistant à améliorer la résistance des plantes cultivées aux maladies provoquées par ces pathogènes a été envisagée. Il est possible par exemple, dans une première approche, d'obtenir cette amélioration par voie sexuée, par la génétique classique, en hybrideant les plantes dont on veut améliorer la résistance avec des variétés tolérantes. Néanmoins, cette approche n'est pas toujours réalisable (variété naturelle tolérante non connue), ou n'est pas autorisée par la

législation comme par exemple en viticulture de par la législation française sur les Appellations d'Origine Contrôlée (A.O.C.) qui limite les cépages à utiliser pour une appellation donnée.

5 Dans une deuxième approche, il est possible, en utilisant les techniques modernes de la biologie cellulaire et moléculaire, d'intégrer dans le génome de la plante un ou plusieurs gènes homologues ou hétérologues permettant la surexpression ou l'expression d'une molécule d'intérêt de 10 nature protéique afin d'augmenter la production d'un métabolite ou d'une voie métabolique ou d'ouvrir une nouvelle voie de biosynthèse ou de synthétiser une nouvelle molécule permettant par exemple d'accroître l'ouverture 15 d'une nouvelle voie de biosynthèse, permettant par exemple d'accroître la résistance de la plante en renforçant ses mécanismes de défense vis-à-vis des pathogènes en cause.

Chez les végétaux, ces mécanismes de défense sont de plusieurs ordres. Les uns peuvent être considérés comme passifs et sont liés aux caractéristiques physico-chimiques 20 des cellules, des tissus épidermiques et/ou des organes de la plante. Les autres appartiennent à la dynamique des interactions gène à gène (gènes de résistance du végétal et d'avirulence du pathogène, mécanismes des interactions hôte-pathogène). Ces interactions peuvent conduire au 25 développement de la réaction d'hypersensibilité (mort rapide des cellules du végétal autour du point d'infection pour bloquer la colonisation de la plante par le micro-organisme) mais aussi à la synthèse et à l'accumulation de toute une série de composés. Parmi ceux-ci, certains 30 peuvent être des constituants pariétaux, impliqués dans la formation d'une barrière « physique » autour du point d'infection (callose, lignine, protéine riche en hydroxyproline : HRGP, etc.), d'autres composés peuvent être des molécules aux fonctions antimicrobiennes plus ou 35 moins bien définies (phytoalexines, protéines associées aux pathogènes : PR protéines (Pathogenesis Related protein), etc.). Parmi les molécules de type phytoalexines qui sont

synthétisées et accumulées par les plantes lors, par exemple, des interactions hôte-pathogène, on trouve notamment les stilbènes qui sont toxiques, notamment pour les micro-organismes. Le terme de stilbène désigne un 5 groupe de substances chimiques possédant le squelette trans-diphényl-1,2-éthylène comme structure de base commune, le resvératrol et la pinosylvine étant parmi les plus simples. Ce squelette de base est synthétisé dans les plantes par une stilbène synthase ou des enzymes appartenées, à partir de substrats comme le malonyl-CoA, le 10 cinnamoyl-CoA ou le coumaroyl-CoA, substances que l'on trouve dans toutes les plantes (précurseurs des flavonoïdes). Les gènes de stilbène synthase ou des enzymes apparentées ont été isolés, séquencés et clonés, notamment 15 à partir de l'arachide, de l'orchidée et de la vigne. On a pu réaliser à partir de ces gènes la transformation de plantes telles que la pomme de terre, la luzerne ou le tabac, présentant, par comparaison aux plantes non transformées, une résistance supérieure à l'attaque par des 20 pathogènes (EP-309862 ; EP-648839 ; MELCHIOR, F. et al., Arch. Biochem. Biophys. 1991, 288, 2, 552-557 ; WIESE, W. et al., Plant Mol. Biol. 1994, 26, 2, 667-677 ; HAIN, R. et al., Nature 1993, 361, 153-156).

L'expression ou la surexpression de ces molécules 25 aux fonctions antimicrobiennes peut permettre d'obtenir une résistance « naturelle » des plantes en réponse à des stress, notamment des stress de type microbien. Cependant, une surexpression constitutive de ce type de protéines ne peut être envisagée sans inconvénient pour la plante (coût 30 énergétique, ralentissement de la croissance, etc.) (FISCHER, R. et al., The plant Journal 1997, 11, 3, 489-498).

D'autre part, dans le cas de certaines plantes 35 comme par exemple la vigne ou des plantes herbacées, on trouve des stilbènes uniquement dans certains tissus sains et à des concentrations très faibles. Par contre, à la suite d'une infection ou d'une lésion, ces stilbènes

augmentent fortement au niveau du site infecté ou lésé, les gènes de stilbène synthase étant inductibles en conditions de stress biotique ou abiotique (par exemple blessures, ultraviolets, etc.).

5 Néanmoins, cette régulation est rarement présente chez les plantes d'intérêt agronomique ou lorsqu'elle est présente, elle peut ne pas être suffisamment efficace. Par exemple, dans le cas de la vigne, l'étude de la synthèse de phytoalexines a montré la présence de stilbènes, dont le
10 resvératrol, dans les tissus sains seulement pour le bois. Dans les tissus de la baie de raisin, la présence de stilbènes est trouvée lorsque, d'une part, la baie est soumise à un stress comme l'attaque par un pathogène (*Botrytis cinerea* pour la pourriture grise ou *Plasmopora viticola* pour le Mildiou), et, d'autre part, uniquement
15 jusqu'à la véraison du jeune fruit. En revanche, la concentration de stilbènes diminue fortement de la véraison à la maturation. Or, les dégâts dus par exemple à *Botrytis* sont rarement rencontrés jusqu'à la véraison mais plutôt
20 lorsqu'on se situe près de la maturation de la baie. C'est pourquoi il est nécessaire de contrôler l'expression de gènes de stilbène synthase par des promoteurs forts, échappant à la régulation naturelle du gène, promoteurs devant être inductibles et en particulier inductibles par
25 le stress lui-même. C'est précisément l'objet de la présente invention.

La présente invention concerne des acides nucléiques comprenant la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne associée à au moins une séquence
30 d'un gène codant pour une stilbène synthase.

L'invention concerne particulièrement des acides nucléiques selon l'invention, caractérisés en ce que le promoteur d'une PR protéine de la luzerne est un promoteur inductible dans les plantes, tissus spécifiques ou non, par
35 un stress biotique ou abiotique.

L'invention concerne également des acides nucléiques selon l'invention, caractérisés en ce que la

séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne est choisie dans le groupe comprenant :

- a) la séquence IND S1,
- b) toute séquence correspondant à un fragment de la séquence IND S1 et ayant effet de séquence promotrice chez les plantes.

On préfère les séquences du promoteur d'une PR protéine de la luzerne qui présentent au moins 80 % d'homologie avec la séquence IND S1. Particulièrement préférées sont celles qui présentent au moins 90 % ou 95 % d'homologie avec ladite séquence.

Les séquences de promoteurs de PR protéines chez la luzerne selon l'invention ont été obtenues à partir des séquences régulatrices de gènes de PR protéines en mettant à profit la réponse incompatible (réaction d'hypersensibilité HR) obtenue dans la relation hôte-parasite entre la luzerne (*Medicago sativa*) et *Pseudomonas syringae* pv *pisi* pour isoler des séquences régulatrices de gènes responsables de cette réaction.

Lors de l'attaque de la luzerne par *Pseudomonas*, l'apparition d'une réaction de la plante est observée dans la zone voisine de la nécrose provoquée par l'infection bactérienne.

Le matériel végétal a donc été prélevé après l'attaque bactérienne afin de constituer une banque d'ADNc à partir des ARNs messagers produits dans les zones voisines de la nécrose. Une amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), utilisant des poly-nucléotides de synthèse correspondant à des motifs conservés de gènes de PR protéines de légumineuses, a permis d'obtenir une sonde radioactive qui a été ensuite utilisée pour sélectionner des transcrits dans la banque d'ADNc. Parmi ceux-ci, l'un d'entre eux (ADNc-PR7) a été retenu car, après séquençage, il présentait une bonne homologie avec des gènes équivalents codant pour des PR protéines, connus pour d'autres plantes (cf. Figures 1 et

1bis représentant le schéma général de la méthode d'isolement du promoteur).

L'analyse a montré qu'il correspondait à un gène codant pour une PR protéine de classe 10 selon la classification de VAN LOON (1994). C'est pourquoi ce gène a été dénommé Ms PR10-1 (*Medicago sativa* PR protéine classe 10, clone 1). L'ADNC PR7 isolé et cloné a permis d'obtenir deux sondes grâce à la présence d'un site *Bam HI* interne (B sur la Figure 1). Celles-ci, EB et BE (E correspondant au site *Eco RI* sur la Figure 1) nommées respectivement 5' et 3', ont été utilisées pour cibler une banque génomique de luzerne. Parmi les clones obtenus, reconnus par les sondes 5' et 3', l'un d'entre eux, C15, a été sélectionné et séquencé (6,1 kb). Il possède lui aussi comme il est logique un site *Bam HI* qui a permis d'obtenir deux nouveaux fragments EB de 2,4 kb et BE de 3,7 kb nommés respectivement E-B(g) et B-E(g), g indiquant la nature génomique des fragments obtenus (voir Figure 1bis). Le fragment E-B(g), situé en 5' du clone C15, comprenant le promoteur et une partie de sa séquence codante du gène Ms PR10-1 a été inséré dans les sites *Eco RI* et *Bam HI* du plasmide bluescript. Le plasmide a été linéarisé grâce à un site *Pst I*, situé en amont de *Bam HI* dans le fragment E-B(g). Sur ce fragment, une délétion de 3' en 5' a été réalisée jusqu'à obtenir la séquence promotrice IND S1 (Figure 3). Une ligature en bout franc¹ a permis de repositionner un autre site *Bam HI*, interne au clone C15, à la fin de la séquence promotrice du gène Ms PR10-1. Dans ces conditions, 13 nucléotides de la séquence codante du gène Ms PR10-1, situés en amont de ce site *Bam HI* interne du clone C15, ont été ainsi intégrés à la séquence promotrice IND S1, l'ensemble peut être isolé par une digestion *Eco RI* / *Bam HI* (voir Exemple 1).

Dans la description, on entend également par PMs PR10-1 tout fragment d'acide nucléique de la séquence IND S1 à effet de promoteur chez les plantes et la séquence IND

S1 avec 13 nucléotides de la séquence codante du gène Ms PR10-1 telle que décrite ci-dessous.

L'invention concerne également des acides nucléiques selon l'invention, caractérisés en ce que la 5 séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase, qu'il soit homologué ou hétérologue, est choisie parmi les gènes isolés à partir des génomes de l'arachide, de l'orchidée, de la vigne et du pin (EP-309 862, EP-464 461).

Parmi lesdits acides nucléiques, on préfère les 10 acides nucléiques codant pour une stilbène synthase de vigne, notamment celles décrites dans l'article de HAIN, R. et al., Nature 1993, 361, 153-156 et dans celui de WIESE, W. et al., Plant Mol. Biol., 1994, 26, 2, 667-677, l'acide nucléique correspondant à la séquence vst1 desdits articles 15 est le plus préféré.

Les acides nucléiques permettant l'expression du ou des gène(s) de stilbène synthase pourront bien entendu comporter, outre ledit ou lesdits gène(s), des séquences 20 notamment de polyadénylation à l'extrémité 3' du brin codant, ainsi que des séquences « enhancer » dudit gène ou d'un gène différent.

Bien entendu, les séquences des acides nucléiques devront être adaptées afin de s'assurer que le gène sera effectivement lu en phase de lecture correcte avec le 25 promoteur et il sera évidemment possible de prévoir d'utiliser, si cela est nécessaire, plusieurs promoteurs du même type ainsi que plusieurs séquences « enhancer ».

Il est également possible d'exprimer à l'aide des 30 acides nucléiques selon la présente invention plusieurs gènes de stilbène synthase, soit placés en cascade, soit portés par des systèmes d'expression différents.

Les acides nucléiques selon l'invention peuvent 35 être utilisés pour la réalisation de systèmes d'expression dans les plantes, systèmes pouvant être inductibles et/ou constitutifs suivant les tissus ou organes de la plante transformés (cf. Exemples 2, 3 et 4).

La présente invention a donc également pour objet des systèmes d'expression d'au moins un gène de stilbène synthase chez les plantes, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins un acide nucléique selon l'invention.

5 Parmi les systèmes selon l'invention, on préfère les vecteurs de transformation et notamment les vecteurs de transformation de type plasmidique. Avantageusement, lesdits vecteurs de transformation sont caractérisés en ce qu'ils peuvent être transférés dans des souches
10 d'*Agrobacterium*.

Les gènes de stilbène synthase pouvant être exprimés par les acides nucléiques selon la présente invention sont placés sous le contrôle du promoteur PMs PR10-1 afin de déclencher chez les plantes des mécanismes
15 de résistance aux pathogènes qui sont sensibles aux stilbènes, notamment au resvératrol, à la pinosylvine ou à leurs dérivés glycosylés comme le picéïde ou à des oligomères comme les viniférines. Parmi ces parasites sensibles aux stilbènes, on peut citer *Botrytis cinerea*,
20 *Plasmopora viticola*, *Eutypa lata*, etc..

Parmi les systèmes d'expression selon l'invention, on préfère ceux caractérisés en ce qu'ils sont inductibles dans les plantes par un stress biotique ou abiotique.

25 Parmi lesdits stress biotiques selon l'invention, on préfère en particulier les stress biotiques engendrés par l'attaque d'un parasite sensible aux stilbènes tel qu'un virus, une bactérie, une levure, un champignon, notamment *Botrytis cinerea* ou *Plasmopora viticola*.

30 Parmi lesdits stress abiotiques selon l'invention, on préfère en particulier les stress abiotiques engendrés par une blessure mécanique, telle que celle causée notamment par un insecte ou par un phénomène physique tel que le vent ou le gel.

35 La présente invention a également pour objet des cellules végétales transformées par un système ou un

vecteur selon l'invention. Avantageusement, lesdites cellules végétales sont des cellules de vigne.

La présente invention concerne également des procédés permettant de transformer des cellules végétales à l'aide d'un procédé microbiologique incluant les systèmes ou les vecteurs selon la présente invention.

L'invention concerne en outre des procédés d'obtention de plantes exprimant un (ou plusieurs) gène(s) de stilbène synthase, caractérisés en ce qu'on transforme des cellules végétales desdites plantes à l'aide d'un système ou d'un vecteur selon l'invention, on sélectionne les cellules exprimant ledit ou lesdits gène(s) et l'on régénère une plante à partir de ces cellules.

Parmi les méthodes de transformation les plus utilisées, il faut citer notamment les méthodes mettant en oeuvre *Agrobacterium*, qu'il s'agisse d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, de biolistique ou toutes autres techniques (électroporation, etc.).

Ces méthodes sont connues (REAM, W., 1989 ; NEGRETIU, I. et GHARTI-CHHETRI, G.B., 1991 ; CASSE-DELBART, F., 1996 ; STANFORD, J.C., 1990) et elles ne seront pas décrites de nouveau en détail.

La technologie, partant notamment de systèmes plasmidiques, permet d'effectuer une première transformation d'une souche de bactéries compétentes, en général *E. coli*, ce qui permet de cloner et de contrôler la structure des plasmides. La souche est ensuite utilisée pour transférer les plasmides recombinants dans des souches d'agrobactéries qui seront ensuite utilisées pour transformer les cellules végétales.

Les plantes comportant un système d'expression ou des cellules selon l'invention font partie de l'invention.

Font également partie de l'invention, les plantes obtenues par la mise en oeuvre des procédés selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne les plantes selon l'invention, caractérisées en ce qu'il s'agit de plantes d'intérêt agronomique, notamment la vigne.

D'autres caractéristiques et avantages des constructions et des procédés selon la présente invention pourront être mis en évidence dans les exemples qui vont suivre.

Légendes des Figures

10

Figures 1 et 1 bis : Schéma général représentant les différentes étapes de la méthode d'isolement du promoteur inductible PMs PR10-1 correspondant à la séquence IND S1.

Figure 2 : Présentation des divers clones isolés et correspondant au Southern blot, hybride avec les parties 5' et 3' de l'ADNc-PR7, délimitées par un site Bam HI (B) interne, détecté dans cet ADNc.

Sites de restriction : E = Eco RI, B = Bam HI.

Les valeurs indiquées sur la figure sont exprimées en kb (kilo bases).

Figure 3 : Séquence d'ADN correspondant à la séquence IND S1, séquence génomique isolée du promoteur inductible de luzerne PMs PR10-1.

Figure 4 : Séquence d'ADN correspondant à la séquence d'un gène de stilbène synthase de vigne modifiée par l'ajout d'un adaptateur (*vstl* modifié).

La partie modifiée est représentée en caractère italique.

Les parties codantes et non codantes (intron) sont représentées respectivement en lettres majuscules et minuscules.

Figure 5 : Séquence d'ADN comprenant la séquence du promoteur inductible PMs PR10-1 (correspondant à la séquence IND S1 en minuscule) associée à la séquence d'un gène de stilbène synthase de vigne modifiée par l'ajout d'un adaptateur (*vstl* modifié, correspondant à la Figure 4). Entre les deux (encadré dans la séquence) se trouvent

(écrits en minuscule, fin du promoteur et en majuscule, début du gène contenant le codon d'initiation de la traduction) les 13 nucléotides venant d'une séquence interne de la phase codante du gène Ms PR10-1, l'ATG ayant été mis en phase de lecture avec le gène *vst1* modifié, ces nucléotides sont donc intégrés à la phase codante de *vst1*.

La séquence du promoteur inductible PMs PR10-1 inclut les 7 des 13 nucléotides de la séquence du gène Ms PR10-1 (en minuscule dans l'encadré).

Les parties codantes et non codantes (intron) de la partie correspondant à la séquence du gène de stilbène synthase de vigne sont représentées respectivement en lettres majuscules et minuscules.

Figure 6 : Mise en évidence de l'induction de gène codant pour une stilbène synthase par les U.V..

Les ARNs sont extraits d'environ 1 g de feuilles 17 heures après induction aux U.V.. 10 à 20 µg sont déposés sur gel dénaturant formaldéhyde-formamide. Après migration (3 V.cm^{-1}), les ARNs sont transférés sur membrane nylon et fixés par exposition aux U.V. ($254 \text{ nm}, 33 \text{ mJ.cm}^{-2}$). Le Northern blot est obtenu par hybridation à 65°C pendant une nuit avec la sonde *vst1* biotinylée.

L'explant de départ est constitué de feuilles isolées de vitroplants de 41B (témoin) ou de 41B transformés génétiquement avec une construction (insert 13 kb, comprenant deux gènes de stilbène synthase complets *vst1*, *vst2*, un morceau d'ADN génomique de vigne et un autre gène de stilbène synthase de vigne (*vst3*) tronqué) intégrant des copies surnuméraires de gènes codant pour des stilbènes synthases de vigne sous contrôle de leurs propres promoteurs (clones 2 et 3 correspondant respectivement aux clones 55-2 et 55-3). 41B : porte-greffe hybride *V. vinifera*, *Chasselas* x *V. berlandieri*.

Figure 7 : Cinétique d'accumulation des ARNm de stilbène synthase après induction aux U.V..

Les ARNs sont extraits d'environ 1 g de feuilles. 10 à 20 µg sont déposés sur gel dénaturant formaldéhyde-

formamide. Après migration (3 V.cm^{-1}), les ARNs sont transférés sur membrane nylon et fixés par exposition aux U.V. (254 nm, 33 mJ.cm^{-2}). Le Northern blot est obtenu par hybridation à 65°C pendant une nuit avec la sonde *vst1* biotinylée.

Les explants sont des feuilles isolées de vitroplants de 41B. Le témoin est un clone non transformé génétiquement contrairement aux clones 2 et 3 (correspondant respectivement aux clones 55-2 et 55-3) qui ont intégré dans leur génome l'insert 13 kb (voir ci-dessus) contenant des gènes codant pour des stilbènes synthases de vigne (*vst1* + *vst2*). 41B : porte-greffe hybride *V. vinifera*, *Chasselas* x *V. berlandieri*.

Figure 8 : Quantités de resvératrol présentes dans les feuilles de vitroplants, traitées 8 min aux U.V. et analysées à différentes périodes après induction.

Les quantités sont exprimées en μg par g de matière fraîche.

NI : non induit.

Le témoin est constitué par des feuilles prélevées sur 41B non transformé. PCT 55-2 et 55-3 représentent deux transformants ayant intégré l'insert de 13 kb comprenant deux gènes de stilbène synthase complets (*vst1* et *vst2*).

Figure 9 : Inhibition de croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*, souche 916T, après 7 jours à 20°C .

La culture du mycélium est réalisée sur milieu malt-glucose contenant les différentes concentrations de resvératrol.

Figure 10 : Planche photo 1

Observations macroscopiques caractéristiques des différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea* 5 jours après inoculation des feuilles de vitroplants par une suspension de conidies - Plantes non transformées.

En haut :

- Gauche : Cépage Folle blanche, clone 280 sensible.

- Droite : Cépage Pinot noir, clone 386 moyennement tolérant.

En bas :

- Gauche : Cépage Ugni-blanc, clone 479 tolérant.

5 - Droite : Porte-greffe 41B tolérant.

Figure 11 : Planche photo 2

Observations macroscopiques caractéristiques de clones de porte-greffe 41B, transformés par différentes constructions (145 : Promoteur PMs PR10-1 - gène vst1 ; 10 55 : insert de 13 kb comprenant deux gènes vst1 et vst2 sous contrôle de leurs propres promoteurs), en interaction avec *Botrytis cinerea*, 5 jours après inoculation de feuilles de vitroplants par une suspension de conidies.

En haut :

15 - Gauche : Clone 145-2.

- Droite : Clone 145-5.

En bas :

- Gauche : Clone 145-6.

- Droite : Clone 55-3.

20 Figure 12 : Planche photo 3

Observations caractéristiques, en microscopie à fluorescence, de différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea*, 5 jours après inoculation de feuilles de vitroplants par une suspension de conidies.

25 ! Fluorescence : bloc de filtres A (excitation de 340 à 380 nm ; filtre d'arrêt à 425 nm). Le resvératrol émet une lumière de fluorescence en blanc bleuté et bleu (selon sa concentration), la chlorophylle en rouge. La zone noire correspond à la zone d'infection par le champignon ou à des zones nécrotiques lorsqu'elles sont petites.

En haut :

- Gauche : Cépage Folle blanche, clone 280 sensible, peu ou pas de synthèse de resvératrol.

30 - Droite : Cépage Pinot noir, clone 386 moyennement tolérant. Synthèse de resvératrol dans les nervures et dans la zone de macération du champignon.

En bas :

- Gauche : Porte-greffe 41B (tolérant) non transformé. Synthèse de resvératrol intense dans les nervures et dans le limbe autour des zones d'infection petites et très localisées (zones nécrotiques).

- Droite : Porte-greffe 41B transformé par la construction 145, c'est-à-dire le promoteur PMs PR10-1 gène vstl, clone 145-5 très tolérant. Forte synthèse de resvératrol autour et, dans la zone d'infection, dans les nervures et sur la presque totalité du limbe de la feuille.

Exemple 1

Obtention de clones génomiques comprenant des séquences régulatrices de gènes PR protéine de luzerne

A) Obtention d'une sonde pour la recherche des promoteurs (cf. Figures 1 et 1 bis)

La réponse incompatible (réaction d'hyper-sensibilité HR), obtenue dans la relation hôte-parasite luzerne (*Medicago sativa*) et *Pseudomonas syringae* pv *pisi* a permis de constituer une banque d'ADNc. Elle a été réalisée à partir d'ARNs messagers extraits et purifiés de la zone voisine de la nécrose provoquée par l'infection bactérienne. Les prélèvements de matériel végétal ont été effectués 6 heures après l'infestation par la suspension bactérienne.

Chez les légumineuses, les PR protéines sont connues pour avoir des motifs conservés, ceci a permis la synthèse d'oligonucléotides correspondant à ces motifs définis à partir des séquençages déjà réalisés sur PR protéines de pois et de soja. Une amplification par PCR a permis d'obtenir une sonde radioactive, utilisée ensuite pour sélectionner dans la banque d'ADNc des transcrits. Parmi ceux-ci, un des clones : ADNc-PR7 a été retenu car après séquençage il a présenté 87 % d'homologie avec les gènes codants pour les PR protéines de pois et de soja. L'analyse a montré qu'il correspondait en fait à un gène

codant pour une PR protéine de classe 10 selon la classification de VAN LOON et al. (1994). Il a été nommé Ms PR10-1 (*Medicago sativa* PR protéine classe 10, clone 1).

Un contrôle, effectué chez la luzerne par Northern blot, a montré que le transcrit correspondant s'accumulait dès 3 heures après l'infection dans le cas de la réaction incompatible, passait par un maximum entre 24 et 48 heures et diminuait lentement à partir de 72 heures.

Ce fragment est caractérisé par l'existence d'un site *Bam HI* interne (noté B sur la figure 1) qui délimite deux parties :

- l'une dite 5', d'environ 340 bases, inclut la région amont de l'ATG (qui est transcrive mais non traduite) et une séquence aval correspondant à 306 bases,

- l'autre dite 3', correspond à la fin de la partie codante soit 165 bases et à la région 3' non traduite soit 186 nucléotides du codon stop jusqu'au début du poly A.

20 B) Isolement de clones génomiques comprenant des promoteurs de PR protéines

1) Isolement de clones génomiques

Une banque génomique de luzerne, préparée dans EMBL4 (titre : $7 \cdot 10^8$ p.f.u. (plate forming units) . ml⁻¹), a été utilisée à cette occasion et $6 \cdot 10^5$ p.f.u. étalées.

25 Pour cribler cette banque, le fragment 5' de Ms PR10-1 (ADNc-PR7) a servi de sonde et 45 clones ont donné un signal, intense sur 13 d'entre eux. Les cartes de restriction et les hybridations, réalisées avec les fragments 5' et 3' de Ms PR10-1, ont permis de conclure à l'existence de 7 clones distincts (cf. Figure 2). La comparaison des tailles des 7 clones (9,3 ; 6,5 ; 6,1 ; 30 5,8 ; 4,8 ; 4,2 ; 2,2 kb) obtenus à partir du criblage de la banque, à celle des bandes détectées sur blot d'ADN génomique de luzerne a montré une bonne concordance entre ces deux types de données expérimentales (cf. Figure 2). Il 35 a donc été possible d'en déduire que les gènes codant pour

la protéine PR7 correspondaient à une petite famille multigénique.

Les fragments (sites *EcoRI/EcoRI*) de ces clones (hormis le clone C12) ont ensuite été sous clonés en totalité ou en partie et les séquençages entrepris.

2) Séquençages réalisés

Un clone a été choisi pour être séquencé en premier, le clone C15 (cf. Figure 1 bis).

Les premiers travaux de séquençage ont mis en évidence la présence d'un intron d'environ 315 nucléotides dans le cadre ouvert de lecture du gène codant pour la PR protéine. Le clone étudié a été analysé ensuite après digestion par *Bam HI* (cf. Figure 1bis).

Clone C15 : 6,1 kb

L'analyse du clone par *Eco RI* et *Bam HI* a permis d'obtenir deux fragments E-B (environ 2,4 kb) et B-E (environ 3,7 kb). Après séquençage et comparaison de la séquence codante (interrompue par un intron de 600 nucléotides) avec celle du Ms PR10-1 (ADNc-PR7), il est apparu que ce clone génomique était absolument identique à cet ADNc de référence.

3) Analyse de l'expression des clones isolés dans le système luzerne-*Pseudomonas*

Les expériences ont porté sur le clone C15, en utilisant la technique d'extension en 5', pour déterminer les messagers effectivement transcrits lors de l'induction des réactions de défense. Cette technique a en outre l'avantage de permettre de localiser le site d'initiation de la transcription. Les résultats ont montré que le clone C15 était effectivement exprimé lors de l'induction des réactions de défense dans les feuilles, lors de l'interaction luzerne-*Pseudomonas*.

Exemple 2

Transformations génétiques réalisées pour vérifier l'activité promotrice du clone isolé

A) Régions promotrices utilisées

Pour ces transformations de contrôle, deux promoteurs ont été retenus : un promoteur témoin et le promoteur PR isolé du génome de la luzerne, issu de C15 (correspondant au promoteur PMs PR10-1).

1) Promoteur CaMV-35S

Ce promoteur, dit constitutif, est classiquement utilisé. Il correspond à la séquence de régulation de la transcription du gène de la sous unité ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). La région promotrice qui a été utilisée pour réaliser la construction avec le gène rapporteur *gus*, correspond en fait à une fraction de ce promoteur, isolée de nouveau sous forme d'un fragment EcoRI/BamHI à partir du plasmide pDH51 (PIETRZAK et al., 1986).

2) Promoteur PR

La région promotrice du clone génomique C15 a été étudiée. Ce promoteur a été appelé par la suite PMs PR10-1. PMs PR10-1 :

Il provient du fragment EcoRI/BamHI (E/B) de 2,4 kb du clone C15 (Figure 1bis). L'intégration de ce fragment dans le plasmide binaire, en amont du gène rapporteur (voir ci-après), a été rendue délicate car aucun site de restriction n'existe sur le clone C15 entre la boîte TATA (initiation de la transcription) et l'ATG (initiation de la traduction). Des expériences de délétion ont donc été réalisées jusqu'à obtenir un fragment de 1,5 kb environ (séquence IND S1). Puis, par ligation en bout franc, un autre site Bam HI a été ajouté au fragment ainsi obtenu pour permettre son insertion en amont des différentes séquences codantes utilisées par la suite. Ce fragment comprend donc en se référant à l'ADNc qui a servi à le cloner et outre la région promotrice amont : 39 nucléotides terminaux de la 5'UTR (UnTranslated Region) du gène Ms PR 10-1, située à 10 bp du codon ATG initiateur, l'ATG du gène Ms PR10-1 et un court fragment de sa région codante (10 bp), juste en amont du site Bam HI intégré.

Tenant compte des sites de clonage, le promoteur ainsi construit présente un ATG potentiel ce qui pourrait conduire à la présence de deux codons ATG, à faible distance l'un de l'autre, lors des constructions de gènes chimériques. Un risque de modification de la phase codante du gène utilisé (gène rapporteur ou gène de stilbène synthase) pourrait alors exister.

Pour les expériences de transformation avec le gène rapporteur, PMs-PR10-1 (PRI) a été utilisé tel quel après clonage dans le plasmide pSK+/- Bluescript de STRATAGENE. Il a pu être de nouveau isolé sous la forme d'un fragment EcoRI/BamHI de 1,5 kb environ.

3) Plasmides utilisés

a) p35S - gus intron (VANCANNEYT et al. 1990)

Ce plasmide est un dérivé de pBin19 (BEVAN, 1984) et possède comme tel les bordures droite et gauche des plasmides binaires permettant l'insertion de la partie comprise entre ces bordures dans les plantes via agrobactéries.

Le développement du gène rapporteur gus intron (intron dérivé du gène LSI de la pomme de terre) a permis d'éliminer les faux positifs (notamment en expression transitoire) dus aux agrobactéries contaminantes. Elles sont incapables d'épisser les introns.

Classiquement ce gène, codant pour une β -glucuronidase, permet, en utilisant un substrat particulier (le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β glucuronide), d'obtenir une coloration bleue. Celle-ci indique alors la nature transformée de la plante analysée et par voie de conséquence la transcription de la séquence codante du gène correspondant à l'enzyme, donc l'induction du promoteur qui la commande.

b) pPR97

Ce plasmide a été construit par l'un des laboratoires participant au projet pour tester l'efficacité de promoteurs (P. RATET, ISV, cité dans SZABADOS et al., 1995). Il a notamment l'avantage de posséder un site de

clonage multiple, permettant une fusion transcriptionnelle avec la phase codante du gène *gus* (*uid A* d'*E. coli*) contenant l'intron *LSI*. Il possède en outre certaines des caractéristiques du plasmide précédent p35S - *gus* intron 5 (bordures d'intégration dans le génome des plantes, gène de sélection permettant la résistance aux antibiotiques de type néomycine : *npt II* gène).

L'activité du promoteur peut être révélée et mesurée par des tests histochimique et enzymatique de type 10 GUS.

4) Dérivés de pPR97

Deux constructions principales ont été faites et utilisées par la suite pour la transformation de plantes modèles.

15 a) pPR97 - 35S

Le promoteur 35S, cloné dans le plasmide pDH51 (cf. paragraphe 5 ci-dessous), a été extrait et inséré dans le site de clonage multiple de pPR97, en amont du gène rapporteur, sous forme d'un fragment *EcoRI/BamHI*. Ce 20 plasmide est à la fois un contrôle positif, pour démontrer que la construction est fonctionnelle, et une référence car le promoteur 35S a été placé dans le même environnement que le promoteur isolé des clones de PR protéine.

b) pPR97-PMs PR10-1

25 Les 1,5 kb ont été insérées dans le même site de clonage que celui défini ci-dessus, sous la forme là aussi d'un fragment *EcoRI/BamHI*.

c) pG3-3

Il a permis de réaliser un contrôle positif fort 30 pour les tests histochimique et enzymatique en clonant deux promoteurs 35S en tandem inversé. Les séquences activatrices des promoteurs agissent alors en synergie. La phase codante du gène *gus* intron a été alors placée sous le contrôle de l'un des deux promoteurs 35S.

35 5) Les souches d'agrobactéries réalisées

Les différents plasmides ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* souche DH5 α

par choc thermique en milieu chlorure de calcium. Après sélection des bactéries transformées sur milieu antibiotique (Kanamycine) et contrôle par miniprep de leur nature recombinante, elles ont servi à transférer les 5 plasmides recombinants dans des souches d'agrobactéries par conjugaison triparentale, en utilisant la souche d'*E. coli* HB101 contenant le plasmide pRK2013 autotransférable (DITTA et al., 1985).

Deux souches d'agrobactéries ont été retenues :
10 EHA 105, *Agrobacterium tumefaciens* désarmée, permettant la régénération de plantes transformées (transformations stables), et A4TC24, *Agrobacterium rhizogenes* utilisée pour obtenir la réaction de type chevelu racinaire (Hairy root) et des plantes composites, possédant des racines
15 transformées mais dont le reste de la plante est de phénotype identique à celui d'origine.

6) Transformations génétiques sur plantes modèles

Deux types de transformations (transitoires et stables) ont été réalisés en utilisant trois plantes modèles *Nicotiana benthamiana*, *Medicago truncatula* et *Lotus corniculatus*.

On exposera principalement les résultats obtenus avec *N. benthamiana*.

7) Transformations transitoires

Cette première série d'expérience a été réalisée pour permettre une vérification rapide de la fonctionnalité des constructions réalisées avec le gène *gus* dans les cellules d'eucaryotes.

Des feuilles de *N. benthamiana* ont donc été 30 excisées et mises en coculture sur milieu gélosé avec les différents dérivés de la souche EHA 105. Des tests histochimiques ont été ensuite pratiqués 48 h après la transformation puis examinés après une nuit d'incubation (12 h).

Les plasmides de contrôle p35S-gus intron et pPR97-35S ont donné une coloration GUS positive bien que faible avec le second plasmide.

Cette faible réactivité vient sans doute d'un problème de construction car à proximité du site d'initiation de la transcription et de l'ATG du gène *gus* une partie du polylinker a dû être gardée. Celle-ci comportant une séquence répétée peut gêner la transcription du gène.

La construction pPR97-PMs PR10-1 a montré une activité du gène *gus* semblable à celle du contrôle positif 35S-*gus* intron. Ce promoteur que l'on attendait inductible, 10 a donc présenté un effet comparable à un promoteur constitutif.

Ce résultat peut être expliqué comme la conséquence soit de l'infection bactérienne soit des blessures effectuées sur les feuilles lors du prélèvement 15 ou de la mise en culture. La première hypothèse ne pouvant être vérifiée, le protocole expérimental a été modifié pour diminuer le stress causé aux explants (élévation de l'osmolarité du milieu de coculture en utilisant des concentrations de saccharose de 10 à 30 g.l⁻¹, réalisation 20 d'une gamme de vide plus ou moins poussée : de 10 à 80 mm de mercure de vide relatif et création de lésions plus ou moins fortes sur les feuilles avec écrasement important ou moyen de l'épiderme).

Les résultats ont montré que plus la pression 25 était importante, plus le nombre de cellules transformées était élevé. Cependant, un compromis doit être trouvé pour obtenir des transformations stables car les nombreuses transformations transitoires, obtenues dans ce cas, se révèlent par la suite souvent létales pour les cellules. 30 Elles sont alors incapables de donner des cals et donc de régénérer des bourgeons puis des plantes. Par ailleurs, la nature inductible du promoteur est en partie confirmée car si la coloration due à la construction 35S-*gus* intron est détectable jusqu'à 5 jours après la coculture, celle 35 obtenue avec pPR97 - PMs PR10-1-*gus* intron apparaît plus rapidement à 48 heures mais décroît ensuite très vite.

8) Transformations stables

a) Tabac : *N. benthamiana*

Une série de transformations a été réalisée avec pPR97-35S, pPR97-PMs PR10-1 et pG3-3. Un nombre important de plantules a été obtenu pour cette série de transformations. Pour chacun des plasmides utilisés, on a cherché à obtenir au moins 7 plantes acclimatées. Cependant, cela n'a pas été possible pour p35S-gus intron où seulement 5 plantes ont été régénérées et acclimatées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 1.

10

Tableau 1 : Transformations stables obtenues sur *N. benthamiana* par transformation avec la souche EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens* et ses dérivés.

Constructions	Cals/explants mis en culture	Bourgeons obtenus	Plantules In vivo Accl.	
p35S-gus intron	10 (45)	6 (1)	5	5
pPR97-35S gus intron	115/122	23	13	12
pPR97-PMs PR10-1 gus intron	135/139	27	20	7
pG3-3-35S en tandem inversé (promot. Fort)	non évalué	37	28	20

15

Légende du tableau 1 :

Les résultats sont exprimés en quantité obtenue.

Accl. : plantules acclimatées.

Nombre de bourgeons par explants : le chiffre entre parenthèses correspond au nombre de bourgeons obtenus à un mois, pour la première série. Pour celle-ci (comportant la construction 35S gus intron), les cals ont été laissés plus

20

longtemps sur le milieu de culture afin d'obtenir un maximum de bourgeons et donc de plantes à acclimater. Pour la seconde série, après un mois, un nombre suffisant de bourgeons a été obtenu et l'expérience a alors été arrêtée.

5 Les transformations génétiques : elles sont faites classiquement sur des morceaux de limbe de feuilles de 1 cm², immersés 30 secondes dans la suspension d'*Agrobacterium* puis, cocultivés 48 heures avant repiquage sur milieu gélosé de division cellulaire et de caulogénèse (MURASHIGE et al., 1962), ANA (acide naphtalène acétique) 0,1 mg.l⁻¹, BAP (benzyl amino purine) 1 mg.l⁻¹, cefotaxime 400 mg.l⁻¹ (élimination des agrobactéries) et kanamycine 70 mg.l⁻¹ (agent de sélection des cellules transformées). Dès l'apparition des premiers bourgeons (environ un mois après coculture), ils sont placés sur milieu d'enracinement identique au premier mais ne comprenant pas d'hormones végétales.

10 L'analyse rapide des résultats, en fonction de l'expression du gène *gus* intron selon la nature du promoteur situé en amont de la phase codante du gène, montre que le promoteur PMs PR10-1 donne les meilleurs résultats de l'ensemble des promoteurs testés. Une analyse plus détaillée est présentée ci-après.

9) Caractéristiques du promoteur PMs PR10-1

25 | Plasmide pPR97-PMs PR10-1-gus intron

Ce promoteur a donné les meilleurs résultats avec des différences d'expression constitutive du gène *gus* selon les organes testés.

a) Activité dans les cals

30 Une expression constitutive forte a été trouvée. Quelques minutes d'incubation ont suffi pour obtenir un test histochimique positif. Le promoteur est donc fortement induit dans ce type de matériel, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par VAN LOON (1985). Les cals en culture *in vitro* sont en état de stress et dans ces conditions les PR protéines sont exprimées.

b) Activité sur plantes entières acclimatées

Racines

Le promoteur est induit et le test histochimique est positif après 2 heures d'incubation (contre 5 heures avec le promoteur 35S). L'activité du gène *gus* n'est pas uniforme dans les racines de tabac, seuls l'épiderme des parties âgées et le méristème apical ont donné la coloration bleue caractéristique du test. Selon la littérature une activité des gènes de défense dans les racines est aussi classiquement observée.

Fleurs

Chez tous les tabacs transformés par cette construction, une forte activité constitutive a été trouvée dans les fleurs et plus particulièrement dans les anthères et le pollen. Une activité du gène *gus* a aussi été décelée dans les trichomes des sépales et plus faiblement dans les pétales. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de VAN LOON (1985) qui indiquent une induction des gènes de défense dans les pièces florales.

Feuilles

Une faible activité constitutive *gus* a été observée dans les trichomes de jeunes feuilles de plantes adultes. Chez le tabac, le stade rosette à larges feuilles correspond au stade juvénile et le stade vieillissant à celui de la formation des graines. Cette faible activité a été constatée majoritairement dans les trichomes pluri-cellulaires. L'expression d'une protéine PR dans de telles structures n'a jamais été décrite à notre connaissance.

Une activité inductrice constitutive du promoteur isolé PMs PR10-1 est donc possible dans les trichomes des feuilles de tabac (3 plantes sur 7) mais elle semble sous l'influence des stades de développement.

En l'absence d'induction par un pathogène, l'activité du promoteur chez le tabac est donc limitée à la racine, aux pièces florales (anthères et pollen) et à quelques cellules de la partie aérienne (trichomes essentiellement).

Exemple 3Autres espèces végétales transformées1) *Medicago truncatula*

Pour cette espèce, on a cherché à réaliser des plantes composites, c'est-à-dire possédant à la fois une partie aérienne de type sauvage (non transformée génétiquement) et des racines transformées.

De jeunes germinations ont été utilisées. Après développement de la racine principale, les hypocotyles excisés, ont été trempés dans une suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 possédant soit le plasmide p35S-gus intron soit le plasmide pPR97-PMs PR10-1-gus intron, de façon à obtenir par la suite des racines néoformées transformées. Après une semaine, des racines ont été obtenues et un test histochimique GUS a été réalisé. Pour cette expérimentation, le témoin a été constitué par de jeunes germinations traitées de manière identique aux lots précédents (hypocotyles excisés mais non trempées dans la suspension d'agrobactéries).

Tous les explants du lot témoin ont néoformé des racines en une semaine, par contre, 50 % seulement ont réagi pour les lots traités par les agrobactéries. Quel que soit le traitement, aucune racine n'a donné de réponse positive au test GUS. En revanche, la base des hypocotyles des lots traités, bien que nécrosée, a souvent réagi pour donner une coloration bleue (présence de cellules transformées). La partie nécrosée des explants a alors été excisée et ils ont été remis en enracinement. 50 % ont alors développé des racines néoformées dont certaines se sont révélées, dans quelques zones, positives au test.

Ce sont donc des racines chimériques (cellules transformées et non transformées) qui ont été obtenues, les parties transformées correspondant à des lignées cellulaires ayant intégré la construction dans une cellule souche de base.

Les deux constructions testées, p35S-gus intron et pPR97-PMs PR10-1-gus intron, ont donné ces lignées cellulaires racinaires transformées dans respectivement 3 et 2 explants sur les 6 mis en expérimentation pour chaque lot.

Bien que le modèle expérimental ne soit pas adapté à l'étude poursuivie (étude de l'expression des protéines PR lors du phénomène de nodulation par *Rhizobium*), il n'en a pas moins démontré que le promoteur PMs PR10-1 est tout aussi fonctionnel dans cette plante que dans la plante d'origine (*Medicago sativa*). .

2) *Lotus corniculatus*

L'expérimentation avait, là aussi, pour but d'étudier l'induction du promoteur lors de la nodulation par la bactérie symbiose *Rhizobium meliloti* NZP 2037 (PETIT et al., 1987). Des plantes composites ont donc été réalisées en transformant des cellules de l'hypocotyle de jeunes germinations de Lotier par *Agrobacterium rhizogenes* souche A4TC24, pour obtenir le phénomène de chevelu racinaire (phénotype hairy root). Une fois celui-ci développé, les racines principales ont été excisées et les plantules ont été placées en milieu liquide pour accroître le développement du phénomène. Une fois les plantes acclimatées, l'étude de l'induction des promoteurs lors de la symbiose fixatrice d'azote a été réalisée en plaçant les plantules en conditions de nodulation (BLONDON, 1964). Les deux promoteurs d'étude retenus ont été les mêmes que ceux utilisés lors de l'expérimentation menée avec *M. truncatula* : 35S et PMs PR10-1. Pour ces deux constructions, moins de 10 % des racines à phénotype hairy root ont montré des racines positives au test GUS. D'une manière générale, les racines ayant ce phénotype ont donné moins de nodules que les racines témoins.

Pour celles obtenues avec la construction comportant le promoteur 35S, seuls les nodules ont présenté

une réponse positive au test GUS, alors que pour l'autre (promoteur PMs PR10-1), la coloration s'est développée sur toute la racine, exceptée au point d'initiation des racines secondaires. Par ailleurs, cette dernière construction n'a 5 permis d'obtenir de nodules sur les racines issues de chevelu racinaire en interaction avec *Rhizobium meliloti*.

Exemple 4

10 Etude de la réaction d'hypersensibilité du tabac transformé avec les constructions utilisant des promoteurs du gène PR de luzerne et le gène gus intron

A) Réaction d'hypersensibilité sur *N. benthamiana* transformé avec les constructions associant le promoteur du gène PR de luzerne et le gène gus intron

15 1) Test de réaction d'hypersensibilité (HR)

La réaction d'hypersensibilité (HR), développée dans l'interaction *N. benthamiana* - *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, a été utilisée dans cette étude. Des plants de tabac transformés, ayant incorporé dans leur génome les différents inserts des plasmides p35S *gus* intron et pPR97-PMs PR10-1-*gus* intron, ont été acclimatés puis infiltrés par une suspension de *P. syringae* (ESNAULT et al., 1993) à une concentration de 10^9 bactéries par ml. La solution a été injectée dans le limbe à l'aide d'une seringue hypodermique. Avec un tel modèle, en 48 heures, la réaction de type HR est considérée comme bien développée. Les feuilles, infiltrées par les suspensions de bactéries, ont été prélevées 24, 48 et 96 heures après inoculation pour évaluer, par test histochimique GUS, l'induction des différents promoteurs étudiés. L'analyse d'une éventuelle réponse systémique a été aussi évaluée, en utilisant le même test histochimique, sur des feuilles situées en dessous de la feuille infiltrée.

35 2) Etude de l'induction des promoteurs en conditions de réaction de type HR

a) Promoteur constitutif 35S

Dans le cas du promoteur constitutif 35S (plasmide pG3-3 par exemple), l'inoculation par *P. syringae* n'a pas modifié la réponse au test et cela en quelques minutes d'incubation. L'infiltration par les bactéries 5 n'altère donc pas l'activité glucuronidase de type constitutif obtenue avec le promoteur 35S.

b) Promoteurs de gènes de protéines PR :
Promoteur PMs PR10-1

10 Comme le montre le tableau 2, ce promoteur est bien inductible par l'attaque par un pathogène. A 24 heures, la réaction de type HR n'est pas encore entièrement développée (48 heures pour l'exposition complète), cependant, le test GUS est déjà positif. Avec les jeunes 15 plants de tabac transformés obtenus, la coloration est faible et produite majoritairement dans le limbe de la feuille infiltrée.

En réponse systémique, réponse au niveau de la feuille inférieure à la feuille infectée, la coloration est uniquement dans le limbe. Les plants de tabac adultes 20 (tiges développées mais n'ayant pas encore fleuries) et juvéniles (en rosette) ont le même type de réponse avec une activité faible du gène *gus*, déterminée par le test histochimique.

Pour les tabacs plus âgés, en fleur ou portant 25 des graines, la coloration obtenue lors du test est plus intense, surtout dans les nervures et les trichomes de la feuille infectée et uniquement dans ces tissus pour la réponse systémique.

Des différences d'expression du gène rapporteur 30 sont donc mises en évidence selon l'âge de la plante. Cette réponse, dépendante du stade de développement de la plante, a été trouvée dans la plupart des études menées sur les protéines PR des végétaux. L'induction du promoteur PMs PR10-1 est un phénomène transitoire puisque l'expression du 35 gène rapporteur n'est plus visible 96 heures après l'inoculation par les bactéries.

L'induction n'est pas non plus limitée à la réaction de type HR obtenue lors de l'interaction plante/bactérie. Le même type de réponse a été obtenu avec la construction PMs PR10-1-gus intron lors d'une infection de l'un des explants par un champignon. Une expression homogène du gène *gus* a alors été visible sur l'ensemble de la feuille infectée, hormis la zone de contamination qui, elle, s'est nécrosée.

10 Tableau 2 : Induction des différents promoteurs étudiés lors de la réaction de type HR entre *N. benthamiana* et *P. syringae*.

Construction	24h après inoculation		96h après inoculat.
	Feuille infiltree	Feuille inférieure	feuille infiltrée réaction type HR
PMs PR10-1	6/7	6/7	0/3
pG3-3 (35S)	3/3	3/3	2/2

15 Légende du tableau 2 :

Les résultats sont présentés en nombre de plantes répondant positivement au test histochimique GUS par rapport au nombre de plantes analysées.

20 B) Expression quantitative du gène *gus* intron sous contrôle des différents promoteurs

La méthode est basée sur un test enzymatique.

Elle utilise :

- a) un extrait brut de l'enzyme codée par le gène *gus* obtenu à partir des plants de tabac transformés, et
- b) un substrat, le p nitrophényl glucuronide. La vitesse d'hydrolyse du substrat est suivie au spectrophotomètre et est rapportée à la quantité totale de protéines de l'extrait.. La méthode nécessite par contre la

présence d'un promoteur fort, en amont du gène *gus*, car elle est peu sensible.

En conséquence, elle n'a pas été appliquée aux essais pour lesquels 12 heures ou plus d'incubation avec le substrat, utilisé pour le test histochimique (X gluc : 5-bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β glucuronide), ont été nécessaires.

Dans ces conditions expérimentales, le promoteur 35S, placé dans le plasmide pG3-3, a donné une vitesse d'hydrolyse du substrat (exprimée en unité arbitraire) 5 fois plus élevée que le promoteur PMs PR10-1, placé quant à lui dans le plasmide pPR97. Par contre, le promoteur PMs PR10-1 a donné une plus forte expression du gène *gus* que le promoteur 35S, si celui-ci est placé dans le plasmide p35S-gus intron. En effet, dans ce dernier cas, aucune détection d'hydrolyse du substrat n'a été obtenue.

De même, les autres constructions n'ont pas permis de donner de valeurs détectables au spectrophotomètre.

20

Exemple 5

Isolement de l'ADN correspondant à un gène de stilbène synthase et expression de la stilbène synthase

Deux méthodes ont été utilisées pour obtenir un gène codant pour une stilbène synthase de vigne. D'une part, les données de la littérature (WIESE et al., 1994) ont permis de connaître la séquence d'un gène. D'autre part, un insert génomique de 13 kb environ a été fourni par BAYER AG (Agrochemical Division Research / Biotechnology-Pflanzenschutzzentrum, MONHEIM, D-51368 LEVERKUSSEN). Il est précisé que la société BAYER a déposé auprès du Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), en Allemagne, des souches d'*E. coli* contenant des plasmides portant des gènes de stilbène synthase de vigne (cf. EP-464 461) : la souche *E. coli* Fier 1 pVst 1 (DSM 6002, déposée le 18 Juin 1990), la souche *E. coli* Fier 2 pVst 2 (DSM 6003, déposée

le 18 Juin 1990), et la souche *E. coli* Fier pVst 1 2 t 3 (DSM 6346, déposée le 11 Février 1991). BAYER a également déposé la souche *E. coli* Nurdug 2010 (DSM 4243, déposée le 17 Septembre 1997) qui contient le plasmide pGS 828.1 qui porte un gène de stilbène synthase d'arachide (cf. EP-309 862). L'insert utilisé pour réaliser les travaux rapportés ci-après correspond en fait à un clone génomique complexe comprenant deux séquences complètes fonctionnelles de gènes de stilbène synthase (gènes *vst1* et *vst2*) et une séquence incomplète *vst3*. Par la suite, la séquence du gène *vst1* a été sélectionnée pour être incorporée aux constructions réalisées. Elle correspond à un fragment génomique de 4,9 kb (séquence fonctionnelle dont le promoteur) qui ne possède pas de sites de restrictions adéquates pour permettre un clonage direct dans les plasmides utilisés habituellement comme vecteurs de transformation. Il a donc été ajouté des sites complémentaires par clonage intermédiaire dans un plasmide pCDNA II.

20 A) Ajout de sites complémentaires par clonage intermédiaire dans un plasmide pCDNA II

Le fragment génomique du gène *vst1* déjà indiqué a été isolé, du plasmide d'origine dans lequel il avait été cloné, sous forme d'un fragment *EcoRI/PstI* (2,1 kb) et cloné à nouveau dans un plasmide pUC19. Une fois cloné, le fragment *vst1* a été incorporé dans les mêmes sites (*EcoRI/PstI*) du plasmide pCDNA II pour changer les sites de restriction, supprimer le terminateur du gène et permettre l'isolement d'un insert *BamHI/BamHI* (1,8 kb). C'est ce fragment, correspondant au cadre ouvert de lecture du gène, qui a été utilisé pour faire les constructions avec les différents promoteurs dont ceux isolés de la banque génomique de luzerne (cf. Figure 4). Cet insert a par la suite été cloné dans pBIN 19 après vérification par Southern blot des tailles des différents fragments obtenus après digestion par les enzymes de restriction adéquates.

B) Etude de l'expression du gène vst1

Pour vérifier l'expression des gènes codant pour la stilbène synthase dans les plants de vigne, une sonde (1,8 kb), comprenant le gène *vst1*, a été préparée à partir du plasmide pCDNA II multiplié dans la bactérie *E. coli* HB 101. La sonde a été ensuite biotinylée par random priming, avec le kit Polar Plex (Plex chemiluminescent kits, Millipore), pour permettre une détection des gènes ou des transcrits codant pour une stilbène synthase par chimiluminescence sur des Southern et Northern blots, réalisés à partir d'acides nucléiques extraits de plants de vigne témoins ou transformés.

1) Utilisation de la sonde *vst1* pour l'analyse d'ADN génomique extrait de vigne 41B (Hybride *V. vinifera* *Chasselas* x *V. berlandieri* ; porte greffe)

Des analyses par Southern blot ont été réalisées après extraction d'ADN génomique puis digestion de celui-ci par *EcoRI*. La sonde *vst1* a permis d'obtenir un grand nombre de bandes (environ 15). Celles-ci correspondent en fait à des fragments contenant des séquences codant pour une stilbène synthase qui constituent une famille multigénique (6 à 8 gènes selon WIESE et al., 1994). Parmi ceux-ci, *vst1*, *vst2* et *vst3* sont fortement homologues entre eux. En outre d'autres gènes peuvent être reconnus par cette sonde, notamment ceux correspondant à la famille multigénique de la chalcone synthétase. Les deux enzymes sont en effet de même structure et de même taille (dimères de sous unité de 41 à 44 kb). Elles utilisent aussi le même substrat et leur séquence d'acides aminés présente un fort taux d'homologie, au moins au niveau du site actif.

Pour vérifier si une telle hybridation croisée était possible, l'ADN de deux plasmides a été extrait. L'un, pCDNA II, contenait le gène *vst1*, et l'autre, pPCV 002, un gène de chalcone synthase de Rosier, disponible au laboratoire. Une sonde biotinylée correspondant au gène de chalcone synthase de Rosier a aussi été préparée. Les

Southern blots obtenus, en réalisant les hybridations croisées, ont montré que la sonde vst1 reconnaissait effectivement le fragment de chalcone synthase de Rosier et inversement. Les signaux émis sont alors plus faibles dans 5 ce cas d'hybridation croisée.

2) Dosage du resvératrol à partir de feuilles de plantes de vigne

Le matériel végétal frais, feuilles ou tiges, est réduit en poudre dans un mortier contenant de l'azote 10 liquide et les composés apolaires sont extraits par le méthanol (1 ml pour 100 mg de matière fraîche : m.f.).

Après centrifugation pour éliminer les débris, l'extrait méthanolique est filtré sur filtre 0,45 µm puis évaporé à sec sous azote. Le résidu est repris dans le 15 méthanol pur (100 µl / 100 mg m.f.). Afin d'éliminer les pigments (chlorophylles notamment), l'échantillon est passé ensuite sur une colonne C18 (Sep-pack WATERS), préalablement équilibrée au méthanol. L'analyse qualitative et quantitative des extraits est réalisée par C.L.H.P. 20 (Chromatographie Liquide Haute Pression) sur une C.L.H.P. WATERS (Modèle 600 E), couplée à un détecteur à barrette de diodes (Modèle 990. WATERS). Le support de chromatographie est composé d'une colonne C18 phase inverse (ultra base C18, 205 x 4,6 mm, 5 µm ; Shandon). L'analyse des composés 25 de l'extrait est effectuée en conditions isocratiques, la phase mobile étant constituée d'un mélange acetonitrile-eau 35/65, V/V avec un débit de 1 ml.min⁻¹.

Un spectre d'absorption est réalisé toutes les deux secondes entre 200 et 400 nm et le resvératrol est 30 détecté à son maximum d'adsorption à 305 nm.

La quantification du resvératrol est réalisée par étalonnage externe à partir d'une droite étalon, obtenue par chromatographie de solutions à 5, 10, 20, 50 et 100 µg.ml⁻¹, réalisées à partir de resvératrol du commerce 35 (Sigma). La concentration en resvératrol, mesurée à partir de l'aire du pic correspondant à la molécule, est rapportée

à l'unité de masse de m. f. ou de m. s. (matière sèche) ou de masse de chlorophylle de l'échantillon dosé.

Exemple 6

5 Constructions d'acide nucléique associant le gène codant pour une stilbène synthase de vigne à différents promoteurs

1) Constructions utilisant des promoteurs constitutifs

Deux promoteurs apparentés ont été utilisés pour réaliser les constructions génétiques devant permettre une expression constitutive.

Dans la première construction, l'ADN de stilbène synthase de vigne (*vst1*) a été placé sous contrôle d'une séquence de régulation constituée par une cassette contenant deux promoteurs 35S du CaMV montés en série (dans la même orientation). A la fin de la séquence codante du gène *vst1* on a aussi ajouté une séquence de polyadénylation du 35S. La construction chimérique ainsi réalisée peut donc se résumer ainsi : p35S (CaMV) - p35S (CaMV) - *vst1* - poly A 35S (CaMV).

20 Dans la deuxième construction, la séquence codante *vst1* a été placée sous le contrôle de quatre séquences « enhancer » isolées du promoteur 35S du CaMV et, montées en série devant le promoteur CaMV 35S et la propre séquence « enhancer » du promoteur du gène de vigne (*vst1*).

25 Les deux séquences chimériques ainsi réalisées ont été d'abord insérées dans le plasmide PMP 90RK puis les plasmides ont été incorporés par la suite dans la souche d'agrobactéries GV3101.

Ces deux séquences de régulation sont considérées comme des promoteurs constitutifs « forts ».

30 2) Construction homologue utilisant l'insert de 13 kb (gènes *vst* sous contrôle de leurs propres promoteurs)

Le fragment d'environ 13 kb d'ADN génomique de vigne a été décrit ci-dessus. Il comprend notamment 2 gènes fonctionnels (*vst1* et *vst2*) codant pour des enzymes stilbène synthases et un gène (*vst3*) incomplet (non

fonctionnel). Cette séquence vigne a été co-intégrée à un plasmide pGV3850 qui a ensuite été introduit dans une souche d'agrobactéries. Elle correspond donc à des cadres ouverts de lecture de gènes *vst* (stilbène synthase de vigne) sous contrôle de leurs propres promoteurs.

Plusieurs séries de plantes 41B, transformées par le plasmide comportant le fragment de 13 kb, ont été obtenues et ont été étudiées et analysées par Southern blot en utilisant 3 sondes différentes (sonde de 1,8 kb du gène *nptII* ; de 2,4 kb du gène de résistance à l'ampicilline et de 1 kb de la bordure gauche du plasmide pBIN 19 comprenant la séquence de fin d'intégration du TDNA). La majorité des plantes retenues a réagi à l'une ou l'autre de ces sondes. Ces clones ont été numérotés selon un code : 55 pour la construction et 2, 3, 5, 6, 7, 9 pour les différents transformants obtenus.

3) Constructions utilisant le promoteur inductible PMs PR-10-1

La construction comprenant le promoteur PMs PR-10-1, isolé à partir des clones génomiques PR de luzerne, a été réalisée (cf. Figure 5).

Construction du plasmide pBin 19 - PMs PR-10-1 - gène *vst1*-Terminateur 35S

Le promoteur PMs PR10-1 isolé de la luzerne et le gène *vst1* comportant chacun un codon ATG initiateur de la traduction, un adaptateur a été réalisé pour cloner le gène *vst1* sans ATG supplémentaire dans la construction. Cet adaptateur a été synthétisé sous la forme de deux oligonucléotides de 11 bp chacun, l'un *Bam HI* compatible, l'autre *Mun I* compatible. L'adaptateur a ensuite été incorporé au site *Mun I* du gène *vst1* cloné dans le plasmide pUC19. L'insert a alors été récupéré par une digestion *Bam HI*, puis cloné dans pBIN 19 entre le promoteur PMs PR10-1 et le terminateur 35S. L'insertion du gène *vst1* avec son adaptateur s'est donc située entre le promoteur PMs PR10-1 et le terminateur 35S. Dans ces conditions, l'ATG du gène

vst1 a été éliminé et 3 codons supplémentaires ont été inclus dans la phase codante de vst1, en amont du gène. Il a été vérifié par séquençage que le cadre ouvert de lecture du gène se trouvait toujours en phase avec le reste de la construction.

Après transformation des plants de 41B, avec l'insert comprenant entre autre la séquence chimérique : promoteur PMs PR10-1-gène vst1 terminateur 35S, les transformants ont été analysés par Southern blot, en utilisant la sonde nptII déjà décrite. Néanmoins, l'intégration complète ne peut être démontrée pleinement par cette méthode et surtout par cette sonde, puisque dans le système d'*Agrobacterium* il est admis que l'insertion dans le génome de la plante commence à la bordure droite pour se terminer à celle de gauche. Le gène nptII étant situé, dans la construction utilisée, près de la bordure droite, une intégration partielle, gène nptII inséré mais blocage ultérieur de l'intégration avant la bordure gauche, est donc possible. Les transformants ont été codés 145 et affectés des numéros 2, 5, 6 pour ceux dont les résultats sont présentés ci-dessous.

Exemple 7

Transformation génétique de la vigne et analyse de l'efficacité des promoteurs étudiés

Comme il a été décrit ci-dessus (Exemple 6), quatre constructions principales ont été réalisées pour transformer le système modèle du laboratoire porte-greffe 41B (*V. vinifera* x *V. berlandieri*). Ce dernier a en effet l'avantage de donner de bons résultats en transformation de suspensions cellulaires embryogènes par les agrobactéries. Environ 50 transformants sont obtenus en moyenne par expérimentation en utilisant 0,1 à 1 µl de P.C.V. (Packed Cell Volume) de cellules embryogènes. De plus, la sélection, le développement des embryons transformés et la régénération en plantes sont rapides. Des plantules in-

vitro, ayant 6 à 8 feuilles bien développées, peuvent être obtenues en deux mois de culture.

5 A) Transformation génétique du 41B avec des vecteurs ayant le gène vst1 sous contrôle de promoteurs constitutifs

Deux constructions ont été testées, l'une comprenant le promoteur double 35S monté en série devant le gène *vst1* et la seconde, constituée par une séquence de régulation composée de 4 séquences « enhancer » 35S (CaMV) montées en série devant le promoteur 35S du CaMV, le tout situé en amont du gène *vst1* possédant sa propre séquence « enhancer ». Quatre séries d'essais ont été réalisées (deux pour chacune des constructions) afin de transformer les cellules embryogènes de vigne. Aucune n'a permis de régénérer des plantes ni même des embryons. Dans tous les cas, une nécrose rapide des suspensions cellulaires embryogènes a été obtenue après les 48 heures de coculture avec les agrobactéries. Ces constructions ne permettent donc pas d'obtenir des plantes transformées exprimant, de manière constitutive, le gène *vst1* sous contrôle de ces promoteurs « forts ». Une hypothèse peut être avancée, l'expression de ce gène pourrait bloquer la régénération en embryons par nécrose rapide des cellules à potentiel embryogène en réponse à la production de phytoalexines stilbéniques.

30 Ces résultats négatifs, obtenus avec les constructions comportant des promoteurs constitutifs de type 35S, démontrent l'intérêt de contrôler une sur-expression du gène *vst1* par un promoteur homologue ou hétérologue inductible notamment par un pathogène.

Ces résultats obtenus sont à rapprocher de ceux publiés par FISHER et HAIN en 1994 qui soulignent le fait qu'ils n'ont pas réussi à faire exprimer de façon constitutive un gène de stilbène synthase de l'arachide à un taux élevé chez le tabac, en utilisant le promoteur 35S du CaMV. Selon ces auteurs il y aurait, avec une telle construction, une régulation négative de l'expression du

gène en condition d'attaque de pathogène. Celle-ci, selon leur hypothèse, pourrait résulter de la mise en place par la plante de mécanismes de défense, induits normalement par les pathogènes (synthèse de PR protéines notamment) qui exerçaient une inhibition sur les promoteurs viraux.

5 B) Transformations génétiques du 41B par des vecteurs ayant le gène vst1 sous contrôle de promoteurs inductibles par des stress abiotiques et/ou biotiques

10 1) Etude de l'expression des gènes *vst* et de leurs cinétiques d'induction par U.V. sur feuilles excisées, isolées en survie et sur plante entière de vitroplants de vigne 41B témoins ou transformés par l'insert de 13 kb

15 Il a été montré que la synthèse de resvératrol (phytoalexine principale de la vigne), produit de la réaction catalysée par une enzyme stilbène synthase, était inductible par les ultraviolets (U.V.), donc sous conditions de stress abiotique (LANGCAKE et al., 1977 ; SBAGHI et al., 1993). En conditions normales, la vigne ne synthétise pas ou très peu de resvératrol, par contre après induction aux U.V. (exposition de 10 minutes aux U.V. à 254 nm, pour une lampe dissipant $600 \mu\text{W.cm}^{-2}$), suivie d'une période de 20 heures d'obscurité, la phyto-alexine est synthétisée dans les feuilles excisées.

20 a) Méthode utilisée

25 Irradiation des feuilles :

- feuilles de vitroplants : à 254 nm pendant 13 minutes pour une lampe dissipant $600 \mu\text{W.cm}^{-2}$,
- feuilles isolées de vitroplants ou vitroplants : à 254 nm pendant 8 minutes pour une lampe dissipant $600 \mu\text{W.cm}^{-2}$,
- extraction et analyse des ARNms du matériel végétal et estimation du resvératrol par fluorescence après excitation à 365 nm à un temps donné après l'induction.

30 Chaque échantillon est constitué par 3 feuilles isolées d'un même plant, induites séparément aux U.V. mais réunies pour l'extraction et le dosage. Le test est réalisé sur des feuilles excisées, isolées de vitroplants, ou sur

des vitroplants en culture sur milieu gélosé, possédant 6 à 7 feuilles bien développées. Les trois feuilles les plus âgées de chaque plantule sont prélevées et utilisées pour le test. L'exposition aux U.V. est effectuée sur leur face supérieure. Après analyse, les quantités de resvératrol obtenues sont exprimées en µg de produit rapportés soit au gramme de poids frais de feuilles analysées, soit au gramme de matière sèche (évaluée sur le culot, après centrifugation après l'extraction méthanolique) ou en mg de resvératrol par g de chlorophylle.

Dans les tableaux ci-dessous, sont indiquées les valeurs obtenues pour des clones de 41B, 55-X, transformés par la construction du clone génomique de 13 kb, où sont présents, dans la séquence utilisée comme insert, deux gènes complets *vst1* et *vst2*, gènes tous deux sous contrôle de leurs propres promoteurs.

b) Etude de stress abiotique (U.V.) sur feuille excisée (expérience N° 1)

Les résultats, correspondant à la construction 55 (insert 13 kb) et aux clones 2 (55-2) et 3 (55-3), sont présentés dans les tableaux 3 et 4 ci-dessous (dosage du resvératrol) et représentés par les figures 6 et 7 (analyse des transcrits). L'étude de la cinétique d'induction par U.V. de l'expression des gènes codant pour la stilbène synthase a été réalisée après une période séparant l'induction par les U.V. des analyses fixée à 17 heures (cf. tableau 3 et Figure 6), ou variant de 0, 8, 17, 24 ou 32 heures après induction (cf. tableau 4 et Figures 7 et 8).

Tableau 3 : Quantités de resvératrol détectées dans les feuilles témoins et transformées, non induites ou 17 heures après induction aux U.V. (exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche)

5

Témoins non transformés		Clone 55-2		Clone 55-3	
Non induit	Induit	Non induit	Induit	Non induit	Induit
0	12	0	11	0	13

10 Légende du tableau 3 : Les feuilles ont été excisées de vitroplants de 41B avant induction aux U.V.. Les clones 55-2 et 55-3 correspondent à des plantes transformées ayant intégré un insert de 13 kb contenant des gènes codant pour une stilbène synthase.

15 La fluorescence, observée dans le bleu-violet à environ 450 nm, est très forte dans les nervures des feuilles excisées et répartie uniformément sur la totalité de la surface de la feuille. Les feuilles témoins, non induites aux U.V., ne présentent pas, quant à elles, de fluorescence. Ces résultats mettent en évidence une expression spécifique des gènes codant pour des stilbène synthases. L'analyse des transcrits par Northern blot, réalisée par la sonde vst1, montre la présence d'un fragment d'environ 1,8 kb dont le signal émis est très intense chez les feuilles induites aux U.V. alors qu'il est absent ou très faible chez les plantes non induites (cf. 20 Figure 6).

25

5 Tableau 4 : Cinétique de l'évolution des concentrations en resvératrol sur des feuilles de vitroplants de 41B, induites aux U.V. prélevées sur les plants en culture sur milieu gélosé, puis isolées et analysées pour leur contenu en resvératrol à différentes périodes après induction.

Temps après induction (h)	Quantité de resvératrol (en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de Matière Fraîche)		
	Témoin	PCT 55-2	PCT 55-3
NI	0	0	0
0	0,6	0	0
8	30,8	12,1	9
17	56,8	71,7	47
24	83,2	81,4	35,2
32	15,5	7,7	151,8

10 Légende du tableau 4 : Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière fraîche. Deux plantes transformées PCT 55-2 et PCT 55-3 ont été analysées en comparaison avec le témoin.

NI : Non induit aux U.V..

15 Dans ces conditions, après stress aux U.V., la quantité de resvératrol retrouvée dans les feuilles témoins est maximale 24 heures après l'induction (de l'ordre de 80 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ m.f. pour le 41B). Cependant, des variations importantes existent selon la date de l'analyse dans le cycle de repiquage des vitroplants : cycle de micro-bouturage.

20 Les résultats obtenus après analyse par Northern blot, en utilisant la sonde vst1 sont présentés à la Figure 7. Au moins deux types de transcrits, de tailles très proches (environ 1,8 kb), ont été détectés. Bien qu'une hybridation croisée avec un transcript de chalcone synthase ne soit pas à exclure, les différents ARNs messagers reconnus correspondent vraisemblablement à l'expression de différents gènes de stilbène synthase. Il a en effet été

montré chez la vigne (WIESE et al., 1994 ; KINDL, communication personnelle) que des différences existaient dans les cinétiques d'induction des différents gènes de la famille multigénique codant pour les stilbène synthases.

- 5 L'analyse par Northern blot a mis en évidence que chez les feuilles excisées de vigne 41B, soumises ensuite au stress abiotique que constitue l'exposition aux U.V., les transcrits de stilbène synthase présentent un maximum d'expression environ 17 heures à 32 heures après induction.
- 10 Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec des cultures de cellules de vigne qui ont montré elles aussi le même modèle d'expression mais avec la présence de deux maxima (WIESE et al., 1994).

c) Etude de stress abiotique (U.V.) sur feuille isolée en survie (expérience N° 2), induction sur vitro-plants avant isolement des feuilles

Le tableau 5 ci-dessous présente les résultats obtenus pour une seconde série de transformants ayant intégré l'insert de 13 kb. L'étude de la cinétique d'induction par U.V. de l'expression des gènes codant pour la stilbène synthase a été réalisée après une période séparant l'induction par les U.V. des analyses variant de 20, 40 ou 60 heures.

Tableau 5 : Concentration en resvératrol de feuilles isolées de vitroplants de vigne après induction aux ultra-violets et extraction à différents temps de survie.

Clone étudié	Temps de survie des feuilles isolées de vitroplants après induction aux U.V. (8mn à 254 nm) et avant extraction du resvératrol		
	20 heures	40 heures	60 heures
41B - Témoin non induit	0	0	0
41B - Témoin induit	281	165	6
Clone 55-2 induit	135	918	58
Clone 55-3 induit	44	931	301
Clone 55-5 induit	392	83	657
Clone 55-6 induit	339	235	43
Clone 55-7 induit	263	411	148
Clone 55-9 induit	386	823	54

5

Légende du tableau 5 :

Les concentrations en resvératrol sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche.

10 41B porte-greffe hybride *V. vinifera Chasselas x V. Berlandieri.*

Les résultats présentés dans le tableau 5 permettent de distinguer deux groupes de plantes :

- le premier correspond au témoin et à deux des transformants 55-6 et 55-7. Ils présentent en général un maximum de concentration en resvératrol compris entre 280

15

et 410 µg.g⁻¹ matière sèche et cela en général 20 heures après l'induction sauf pour le clone 55-7 où il est situé à 40 heures ;

- le second groupe présente quant à lui des maxima plus élevés soit presque le double du premier (820 à 930 µg.g⁻¹ matière sèche). Il est constitué uniquement de transformants (55-2, 55-3 et 55-9). Le maximum est exprimé 40 heures après l'induction aux U.V., par contre, 20 heures après induction, ces plantes ont souvent des concentrations très inférieures à celles du premier groupe. C'est le cas par exemple des clones 55-2 et 55-3 (135 et 44 µg.g⁻¹ de matière sèche respectivement). L'un des clones, 55-9, est cependant intéressant puisqu'il montre des concentrations en resvératrol supérieures à celles du témoin dans tous les cas (386, 823 et 54 µg.g⁻¹ de matière sèche pour des temps de 20, 40 et 60 heures après induction).

Dans ce système de feuille en survie, un témoin non induit ne présente jamais de resvératrol et dans presque tous les cas (hormis le clone 55-5 qui a un comportement particulier), la concentration en resvératrol chute de manière drastique 60 heures après induction.

d) Etude de stress abiotique (U.V.) effectuée sur vitroplants en culture sur milieu gélosé

Cette étude, effectuée sur plante en croissance sur milieu gélosé, permet d'analyser la production de resvératrol en condition d'expression éventuelle d'autres mécanismes de défense de la plante, tout au moins ceux susceptibles de s'exprimer dans les conditions de culture in vitro. De plus, elle permet de suivre la synthèse de resvératrol sur une période plus longue (dans les études précédentes, la feuille isolée se nécrose au-delà de 72 heures).

Quatre clones de vitroplants en culture de 41B transformés (55-2, 3, 5, 6) ont été traités par les U.V.

dans les mêmes conditions que précédemment (8 min à 254 nm), les feuilles n'étant prélevées sur la plante que 20 heures après induction. Les résultats obtenus ont été comparés au témoin non transformé ainsi qu'à un clone de 5 *Vitis rupestris* et à 3 clones de cépage *Vitis vinifera*, connus sur le terrain pour avoir une sensibilité plus ou moins grande aux attaques de *Botrytis* sur les baies.

La littérature (SBAGHI et al., 1993) montre en effet qu'une corrélation existe entre la sensibilité des 10 baies à *Botrytis*, évaluée au vignoble, et la teneur en résvératrol de feuilles de vitroplants induites aux U.V.. Les résultats sont présentés au tableau 6 ci-dessous.

15 Tableau 6 : Résultats des dosages du résvératrol par H.P.L.C. réalisés 20 h après induction 8 mn aux U.V. 254 mn sur différentes variétés de vigne.

Variété testée	(résvératrol) µg.g ⁻¹ poids sec
Rupestris 215	351
Porte-greffe 41B	237
Ugni-blanc 479	209
Pinot noir 386	86
Folle blanche 280	37
Pct 55-2	361
Pct 55-3	235
Pct 55-5	115
Pct 55-6	539

Légende du tableau 6 :

20 L'induction aux U.V. est réalisée sur des vitroplants en culture sur milieu gélosé. Les feuilles sont prélevées et extraites pour analyse 20 heures après le traitement.

PCT 55-2, 3, 5, 6 - transformants ayant intégré l'insert 13 kb dans leur génome. Les résultats représentent la moyenne de 3 répétitions.

5 Ces résultats indiquent bien qu'une corrélation existe chez les variétés et cépages entre sensibilité à *Botrytis* et teneur en resvératrol des feuilles 20 heures après induction. Deux groupes sont identifiables parmi les variétés et cépages non transformés. Le premier, formé de
10 *V. ruspestris*, *V. vinifera x V. berlandieri* (41B) et Ugni-blanc, correspond à celles et à ceux qui sont relativement tolérants au champignon. Le second, constitué du Pinot noir et de la Folle blanche représente ceux considérés comme moyennement tolérants voire très sensibles (Folle blanche
15 par exemple).

Les transformants ont, quant à eux, en moyenne, des teneurs en resvératrol, 20 heures après induction, supérieures ou égales au témoin non transformé 41B (539, 362 et 236 µg.g⁻¹ matière sèche pour respectivement les
20 clones 55-6, 55-2 et 55-3 et 237 pour le témoin).

Pour le clone transformé 55-5 par contre, la concentration obtenue est la moitié de celle du témoin. Si l'on compare ces valeurs, exprimées en µg.g⁻¹ de poids sec, à celles des feuilles isolées (tableau 5), on s'aperçoit
25 qu'elles sont similaires pour le témoin mais par contre que les variations existent pour les transformants analysés 20 heures après induction. Celles-ci sont quelquefois très importantes (135 pour l'induction sur feuilles isolées et 362 pour induction sur vitroplants pour le clone 55-2 ; 44 contre 236 pour le clone 55-3 ; 392 contre 116 pour le clone 55-5 et 339 contre 540 pour 55-6). De plus, une grande variabilité existe entre les différentes répétitions.

35 2) Etude comparée de l'expression du gène *vst* et de sa cinétique d'induction par stress biotique sur vitroplants de vigne 41B, transformés par l'insert de 13 kb et par la

construction comprenant uniquement le gène *vst1* sous contrôle du promoteur PMs PR10-1.

Les résultats ci-dessus (chapitre 1), obtenus sur des vitroplants ayant intégré par transformation génétique 5 des copies supplémentaires des gènes de stilbène synthase (sous forme d'un insert de 13 kb comprenant deux séquences fonctionnelles *vst1* et *vst2*), montrent qu'une surproduction de resvératrol, produit de la réaction catalysée par l'enzyme stilbène synthase, est possible dans certains 10 transformants lorsque ces gènes sont sous contrôle de leurs propres promoteurs et en réponse à un stress abiotique tel que l'irradiation par les U.V..

Par rapport à ces résultats, la production de resvératrol sur deux types de transformants a ensuite été 15 vérifiée, le premier représentant un clone de 41B ayant intégré l'insert de 13 kb (gènes de stilbène synthase *vst1* et *vst2* sous contrôle de leurs propres promoteurs), le second plusieurs clones ayant incorporé le gène *vst1* seul 20 sous contrôle de la séquence de régulation de gènes de défense de la luzerne PMs-PR10-1. Cette comparaison a été faite après induction par un stress biotique causé par *Botrytis cinerea*.

a) Méthodes utilisées

25 | a) Mise en évidence de la fongitoxicité de la molécule resvératrol sur *Botrytis cinerea*

Les données de la littérature sur la molécule en tant que fongitoxique sont contradictoires. Selon DAÏ (1994), le resvératrol montre bien une action inhibitrice 30 sur le développement des zoospores de *Plasmopora viticola* (agent du Mildiou). Par contre, selon PONT et PEZET (1990) il ne bloque pas la germination des conidies de *Botrytis cinerea*.

L'action de la molécule a été étudiée sur la croissance des hyphes mycéliens de *Botrytis cinerea* en 35 culture sur un milieu Malt-Agar, comprenant une gamme de

dilution de resvératrol variant de 10^{-1} M à $3,7 \cdot 10^{-3}$ M et incubés à température ambiante 7 jours. Les résultats ont montré une action inhibitrice de la molécule ($IC_{50} = 500 \mu\text{moles.l}^{-1}$), avec diminution exponentielle du diamètre moyen de croissance du champignon pour des concentrations supérieures à $125 \mu\text{moles.l}^{-1}$. Par contre, des concentrations de $37 \mu\text{moles.l}^{-1}$ n'inhibent que très peu la croissance du mycélium (cf. Figure 9). Cette inhibition est cependant levée progressivement après 7 jours de culture dans ces conditions, par ailleurs très favorables à la croissance du champignon. Au bout de 20 jours, le champignon finit par contaminer l'ensemble de la surface de culture.

15 **β) Test de criblage de la tolérance de vitroplants de vigne à *Botrytis cinerea***

Le test mis au point a consisté à inoculer des feuilles de plantules, cultivées in vitro sur milieu de microbouturage, par dépôt sur leur face supérieure de $20 \mu\text{l}$ d'une suspension de conidies à $1 \cdot 10^{-4}$ conidies. ml^{-1} (200 conidies par dépôt) dans un milieu malt-glucose. Les plantules, ainsi inoculées sur 4 feuilles différentes, sont cultivées ensuite en chambre climatique (photopériode 16 h jour, 8h nuit ; température 24°C ; humidité 70 %). Deux jours après l'inoculation, les feuilles de rang 4, les plus jeunes, ont été observées (nécroses et macérations présentes dénombrées grâce à une caméra reliée à un moniteur de télévision) et extraites au méthanol pour permettre de doser le resvératrol synthétisé en réponse à l'attaque par *Botrytis*. A 5 jours, les feuilles numéro 2 ont été prélevées pour être observées en microscopie à fluorescence. Une observation macroscopique (nécroses et macérations sur les feuilles) et un dénombrement des feuilles présentant des organes de fructification du champignon (conidiophores) ont aussi été réalisés sur les feuilles numéro 3. Enfin à 9 jours, des feuilles en

interaction avec le champignon, prélevées sur trois plantes différentes, ont été extraites par le méthanol pour doser le resvératrol.

γ) Induction de stress biotique par dépôt de suspension contenant des spores de *Botrytis cinerea* sur des feuilles de vitroplants - test de tolérance à *Botrytis*

Ce test de confrontation directe a été réalisé selon la technique déjà décrite (cf. paragraphe précédent).

Il en est de même pour les observations effectuées. Pour chaque variété ou clone transformé, quatre vitroplants ont été utilisés et pour chacun d'entre eux trois feuilles développées de rang 2, 3, 4 ont été inoculées par la suspension de conidies (200 conidies dans 20 µl de milieu malt-glucose). Douze inoculations ont donc été réalisées pour chaque variété ou clone et les analyses et les observations suivantes ont été faites :

◆ Deux jours après inoculation :

- observation des feuilles de rang 4 pour les symptômes foliaires (zone de macération du champignon ou spots nécrotiques, constitués de petites zones brun noir, localisées autour des spores de champignon, ou sans symptômes visibles), et

- dosage du resvératrol sur ces mêmes feuilles.

◆ Cinq jours après inoculation :

- observation des feuilles de rang 3 pour les symptômes foliaires avec dénombrement de celles qui portent des conidiophores (organes de fructification du champignon), et

- observation en microscopie à fluorescence des feuilles de rang 2 pour localisation des zones de synthèse du resvératrol.

◆ Neuf jours après inoculation :

- dosage du resvératrol dans trois feuilles, issues de trois plantes différentes, en interaction avec le parasite.

Pour chaque série expérimentale, trois cépages de *Vitis vinifera* ayant des sensibilités différentes aux attaques de *Botrytis* sur les baies ont été étudiés : Folle

blanche (sensible), Pinot noir (moyennement tolérant), Ugni-blanc (tolérant) et le porte-greffe 41B (tolérant) ainsi que quatre de ses transformants : l'un ayant inséré des copies surnuméraires des gènes codant pour une stilbène synthase (insert 13 kb), clone 55-3 et les trois autres, représentant des transformants de la construction promoteur PMs PR10-1-gène *vst1* soient les clones 145-2, 145-5 et 145-6.

10 b) Résultats obtenus

Les résultats sont présentés dans les tableaux 7 et 8, pour les symptômes foliaires observés 2 ou 5 jours après l'inoculation et, dans les tableaux 9 et 10, pour les dosages de resvératrol rapportés soit au poids sec, soit à la teneur en chlorophylle.

15

Tableau 7 : Observations macroscopiques des interactions feuilles de vitroplants-*Botrytis cinerea* à 2 jours

Variété testée	Nombre de feuilles n° 4, observées sur 4 plantes différentes, où apparaissent les symptômes suivants		
	Zones de macération	Spots nécrotiques	Aucun symptôme visible
Folle blanche 280	4	1	0
Pinot noir 386	3	4	0
Ugni-blanc 479	1	2	1
41B	0	4	0
Pct 55-3	2	3	0
Pct 145-2	0	3	1
Pct 145-5	0	1	3
Pct 145-6	1	1	2

Légende du tableau 7 :

- Zones de macération : zone large et diffuse où *Botrytis* détruit rapidement les cellules végétales. Ces zones ont une couleur beige marron clair.

5 - Spots nécrotiques : zones très petites circonscrites autour du champignon. Ces spots sont de couleur brun-noir.

Tableau 8 : Observations macroscopiques des interactions feuilles de vitroplants-*Botrytis cinerea* à 5 jours

10

Variété testée	Nombre de feuilles n° 3, observées sur 4 plantes différentes, où apparaissent les symptômes suivants		
	Zones de macération	Spots nécrotiques	Aucun symptôme visible
Folle blanche 280	4	0	4
Pinot noir 386	3	1	2,5
Ugni-blanc 479	2	1	0,5
41B	1,5	2	0,5
Pct 55-3	2	2	1
Pct 145-2	1,5	2	1
Pct 145-5	0,5	4	0
Pct 145-6	3	2	1

Légende du tableau 8 :

- Zones de macération : zone large et diffuse où *Botrytis* détruit rapidement les cellules végétales. Ces zones ont une couleur beige marron clair.

15

- Spots nécrotiques : zones très petites circonscrites autour du champignon. Ces spots sont de couleur brun-noir.

Tableau 9 : Résultats des dosages du resvératrol par H.P.L.C. sur différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea* depuis 2 jours

Variété testée	resvérat. mg.g ⁻¹ chloroph.	resvérat. µg.g ⁻¹ poids sec
Folle B280	5,1	101
Pinot N386	4,3	102
Ugni B479	3,9	86
Porte-g41B	5,7	112
Pct 55-3	4,6	118
Pct 145-2	6,9	170
Pct 145-5	2,2	83
Pct 145-6	4,3	107

5

Légende du tableau 9 :

- resvérat. : resvératrol ; chloroph. : chlorophylle

Folle B 280 : Folle blanche 280 ; Pinot N 386 : Pinot noir

386 ; Ugni B 479 : Ugni-blanc 479 ; Porte-g41 B : Porte-greffé 41B.

10

Tableau 10 : Résultats des dosages du resvératrol par H.P.L.C. sur différentes variétés de vigne en interaction avec *Botrytis cinerea* depuis 9 jours

15

Variété testée	resvératrol mg.g ⁻¹ chlorophylle	resvératrol µg.g ⁻¹ poids sec
Folle blanche 280	4,0	38
Ugni-blanc 479	31,7	145
Porte-greffé 41B	11,9	59
Pct 145-5	602,1	2558

◆ Deux jours après inoculation :

L'observation a porté sur les feuilles les plus jeunes (rang 4). Dans presque tous les cas, hormis le 41B et les clones 145-2 et 145-5, des zones de macération ont été observées (colonisation du champignon). Les cépages sensibles en ont présenté plus que les cépages tolérants : Folle blanche et Pinot noir respectivement 4 et 3 zones contre 1 seulement pour le cépage Ugni-blanc. Seuls les transformants 145 (promoteur PMs PR10-1-gène vst1) et l'Ugni-blanc ont donné des feuilles sans symptômes visibles. Les zones nécrotiques, réaction de défense de la plante, sont apparues principalement sur le 41B et ses transformants et, pour les cépages, sur Pinot noir et Ugni-blanc.

Si l'on compare ces observations aux dosages de resvératrol (tableau 9), aucune corrélation ne peut être établie puisque, ramenées au poids sec, les teneurs en resvératrol de ces feuilles sont comparables avec environ 100 µg.g⁻¹ de matière sèche. Elles s'établissent pour l'ensemble des vitroplants examinés à des valeurs comprises entre 4 et 5 mg.g⁻¹ chlorophylle.

Seuls le porte-greffe 41B et surtout le transformant 145-2 ont des valeurs supérieures. Le clone 145-5 quant à lui a une valeur plus faible (de moitié environ).

Une comparaison peut aussi être établie avec les teneurs en resvératrol obtenues précédemment 20 heures après induction des vitroplants aux U.V. (tableau 6). Bien que la période de prélèvement ne soit pas comparable (20 heures pour le stress abiotique contre 48 heures pour les stress biotiques, mais il faut prendre en compte le temps nécessaire à la germination des spores), on constate en général des teneurs plus faibles en resvératrol après un stress biotique (de moitié ou du tiers, cas de l'Ugni-blanc), sauf pour le Pinot noir où elle est comparable et

pour la Folle blanche où elle est environ trois fois plus forte.

Dans tous les échantillons analysés, on peut souligner une forte dispersion des valeurs obtenues dans les différentes répétitions effectuées. Cette variabilité entre différentes feuilles d'un même plant, déjà observée avec les échantillons ayant subi les inductions aux U.V., pourrait, là aussi, avoir plusieurs origines. Parmi les hypothèses les plus plausibles, on peut citer :

Une grande variabilité de réaction entre vitroplants d'un même clone face à l'agression du champignon. Les symptômes foliaires variables, obtenus après inoculation par les spores de *Botrytis* semblent le confirmer (variabilité dans l'infection, dans l'état physiologique de chaque plante, etc.).

Le dosage, effectué sur la feuille entière, n'est pas représentatif des variations de synthèse du resvératrol existant au niveau de chaque cellule qui la compose. Il est, en effet, généralement admis que, dans les réactions d'hypersensibilité à un parasite, toutes les cellules du limbe ne synthétisent pas les molécules de défense. Seules sont induites à la synthèse de phytoalexines les cellules situées près des zones d'attaque du champignon. Les analyses, réalisées dans ce test, ne représentent donc que des valeurs correspondant à un taux moyen de resvératrol présent dans le limbe des feuilles en interaction avec le parasite. Un phénomène de dilution important peut donc se produire, notamment pour les plantes résistantes, entre les concentrations présentes dans les cellules induites à la synthèse de la phytoalexine et la valeur trouvée lors de l'analyse de la feuille entière. Ceci est sans doute plus marqué dans la première période d'expression des réactions de défense de la plante.

◆ Cinq jours après l'inoculation :

Les observations des symptômes montrent (planches photos n° 1 et 2 (Figures 10 et 11) et tableau 8) que des zones de macération sont formées, en plus ou moins grand

nombre, chez tous les cépages, porte-greffe et transformants étudiés. Celles-ci sont souvent associées à la présence de conidiophores (organes de fructification du champignon). Parmi les cépages et le porte-greffe 41B 5 témoin, la Folle blanche, espèce la plus sensible à *Botrytis*, présente des attaques sur toutes les feuilles étudiées et aussi des conidiophores. Si l'on établit une hiérarchie dans la gravité des symptômes viennent ensuite le Pinot noir, puis l'Ugni-blanc et enfin le 41B. 10 Cependant, pour ces deux derniers, les conidiophores ne sont développés que sur une demi-feuille seulement. En ce qui concerne les clones transformants, trois clones ont donné des réactions plus ou moins similaires : 55-3, 145-2 et 145-6. Seul le clone 145-5 a présenté une bonne 15 tolérance au parasite, puisqu'une demi-feuille seulement a permis le développement d'une zone de macération et aucun conidiophage n'est visible.

Par contre, pour ce clone, la majorité des feuilles a réagi à l'agression en formant des zones 20 nécrotiques. Un exemple est d'ailleurs présenté sur la planche photo 2 (Figure 11).

Pour vérifier si ces résultats correspondaient bien à des différences notables dans l'induction de la synthèse du resvératrol et donc à l'expression de gène(s) 25 codant pour une stylbène synthase, des feuilles, inoculées par les spores de *Botrytis*, ont été observées en microscopie à fluorescence (équipé du filtre A : filtre excitation de 340 à 380 nm ; filtre d'arrêt à 425 nm). Dans ces conditions, la chlorophylle fluoresce en rouge, le 30 resvératrol en blanc bleuté ou bleu plus foncé selon sa concentration. Deux cépages, Folle blanche (sensible) et Pinot noir (moyennement tolérant), le porte-greffe 41B (tolérant) et un de ses transformants 145-5 (construction Promoteur PMs PR10-1-gène *vst1*) ont été étudiés par cette 35 méthode. Les photographies de ces observations sont présentées planche photo 3 (Figure 12). Des différences remarquables sont visibles. Sur la Folle blanche, le

mycélium du parasite (en noir sur la photo) s'est développé et a colonisé les tissus. Pratiquement aucune cellule bleutée n'est observable. Sur le cépage Pinot noir on note une zone bleutée formant barrière autour et dans la zone 5 d'inoculation et de début de colonisation du champignon. La croissance du mycélium est ralentie voire bloquée par cette barrière, même si un processus de macération des tissus a déjà été engagé. Une coloration bleue plus intense existe aussi dans les nervures. Sur le porte-greffe 41B témoin, 10 dans la zone étudiée, des cellules éparques, réparties dans tout le limbe, montrent une fluorescence bleue claire avec une intensité plus grande dans les nervures. Aucun processus de colonisation du champignon n'a été engagé et des zones nécrotiques éparques, limitées à quelques 15 cellules, sont visibles. Sur le 41B transformé par la construction promoteur PMs PR10-1-gène *vst1*, les résultats sont spectaculaires pour le clone 145-5. Un début de colonisation des tissus par le champignon a été engagé (zone noire) mais, très vite, une barrière cellulaire, 20 synthétisant du resvératrol, s'est formée autour de cette zone, bloquant ainsi son extension. Dans la zone de macération du champignon des cellules bleues sont encore visibles. En outre, une grande partie des cellules du limbe de la feuille qui ne sont pas en contact avec le 25 champignon, ont synthétisé, elles aussi, du resvératrol. Les nervures aussi présentent une intense coloration bleue.

Ces observations mettent en évidence qu'il existe donc une corrélation entre l'intensité des symptômes foliaires, développés après inoculation de vitroplants par 30 des spores de *Botrytis*, et la teneur en phytoalexine de type stilbénique des feuilles. Les plantes les plus tolérantes sont celles qui présentent une synthèse de resvératrol répartie sur une grande partie du limbe. Ceci est réalisé avec le transformant 145-5, comportant un gène codant pour une stilbène synthase sous contrôle du 35 promoteur PMs PR10-1, isolé de la luzerne.

♦ Neuf jours après inoculation :

Les observations des symptômes ont montré que les vitroplants de Folle blanche étaient aussi dans ce test particulièrement sensibles aux attaques de *Botrytis*. A neuf 5 jours, ils sont tous envahis par le champignon et ont, dans la plupart des cas, une forte dégradation de leur chlorophylle. En ce qui concerne le cépage Ugni-blanc et le porte-greffe 41B, aucune différence n'a pu être constatée 10 dans l'expression des symptômes foliaires. D'une manière générale, les résultats des observations des symptômes effectuées à cinq jours sont retrouvés en un peu plus développés pour les zones de macération. Par contre, les feuilles qui présentaient des conidiophores se sont nécrosées dans la plupart des cas.

15 4 variétés ont été analysées pour leur teneur en resvératrol : la Folle blanche (sensible), l'Ugni-blanc (tolérant), le 41B (tolérant) et le 145-5 (41B transformé Promoteur PMs PR10-1-gène *vst1*). Pour le 145-5, neuf jours après inoculation, il ne présentait toujours pas de 20 symptômes notables d'attaque par *Botrytis*. Les résultats des analyses de teneur en resvératrol sont présentés tableau 10. Exprimées en µg de resvératrol.g⁻¹ de poids sec ou en mg.g⁻¹ de chlorophylle, les concentrations de resvératrol permettent le classement suivant des variétés, 25 en allant de la plus faible valeur vers la plus forte : Folle blanche < 41 B < Ugni-blanc < 41B transformé 145-5.

30 Les différences de concentration sont très importantes, puisque le transformant 145-5 a une valeur près de 43 fois supérieure à celle du 41B témoin (en g⁻¹ de poids sec) et de 50 fois supérieure si elle est exprimée en g⁻¹ de chlorophylle. Les dosages confirment donc bien les évaluations effectuées en microscopie à fluorescence à cinq jours (voir planche photo 3, figure 12).

35 En ce qui concerne l'Ugni-blanc et le 41B, le tableau 10 montre que le premier a environ 3 fois plus de resvératrol que le second, quelles que soient les unités

choisies. Pourtant, ces deux variétés réagissent de manière identique en terme de symptômes foliaires. D'autres phénomènes que la synthèse de resvératrol peuvent être mis en jeu pour expliquer cette similitude de tolérance. Il 5 faut noter aussi que dans les conditions du test, la confrontation plante-*Botrytis* est particulièrement favorable à ce dernier. Les conditions d'environnement existant dans un conteneur *in vitro* font qu'après 20 jours de culture environ, tous les vitroplants quels qu'ils 10 soient, sont infectés par le champignon.

c) Conclusions sur la transformation génétique de la vigne et l'analyse de l'efficacité des promoteurs étudiés

Les expériences sur cellules embryogènes de 41B (porte-greffe hybride *V. Vinifera* x *V. Berlandieri*) 15 transformées par *Agrobacterium tumefaciens* comprenant les différentes constructions, n'ont pas permis de régénérer des plantes avec les constructions qui comportaient le gène *vst1* sous contrôle du promoteur 35S ou de ses dérivés. Aucune activité constitutive forte sur l'ensemble de la 20 plante n'a donc pu être obtenue.

Par contre, des plants de vigne ayant incorporé les constructions PMs PR10-1-gène *vst1* et insert 13 kb (gènes *vst1* et *vst2* sous contrôle de leurs propres promoteurs) ont été obtenus. Ces plantes, transformées 25 génétiquement, ont pu être comparées au témoin (41B non transformé) et multipliées par micropropagation.

Comparées aux témoins non transformés, peu de différences ont pu être constatées sous stress U.V. (stress biotique) dans les concentrations en resvératrol des 30 différents transformants obtenus avec l'insert de 13 kb, où sont présents dans la séquence utilisée comme insert deux gènes *vst1* et *vst2*, gènes tous deux sous contrôle de leurs propres promoteurs.

Par contre, les résultats montrent que la 35 construction chimérique PMs PR10-1-gène *vst1* permet une surexpression de la phytoalexine resvératrol (produit de la

réaction catalysée par une stilbène synthase), en présence d'un stress biotique causé par *Botrytis cinerea* de l'ordre de 50 fois plus, 9 jours après infection. Ces plantes montrent alors une meilleure tolérance si on les compare 5 soit au témoin, soit à des transformants obtenus avec l'insert 13 kb.

Ainsi, la transformation avec la construction associant le promoteur inductible PMs PR10-1 de luzerne avec les gènes de stilbène synthase, permet de surexprimer 10 dans les plants de vigne les gènes de stilbène synthase en réponse à un stress comme par exemple l'attaque d'un pathogène.

Références

- BEVAN M., 1984. Binary Agrobacterium vectors for plants transformation. *Nucl. Acid. Res.*, 12, 8711-8721.
- BLONDON F., 1964. Contribution à l'étude du développement des graminés fourragères : Ray gras et Dactyle. *Rev. Gén. Bot.*, 71, 293-381.
- CASSE-DELBART, F., 1996. La transgénèse Végétale. Les Plantes Transgéniques en Agriculture, John LIBREY Eurotext, ISBN : 27420-0149-2, 59-88.
- DAÏ G.H., 1994. Etude des facteurs biochimiques de résistance de la vigne (*Vitis spp*) au mildiou (*Plasmora viticola*). Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (France).
- DITTA G., SCHMIDTHAUSER T., YACOBSON E., LU P., LIANG A.W. et al., 1985. Plasmid related to the broad range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13, 149-153.
- ESNAULT R., BUFFARD D., BREDA C., SALLAUD C., EL TURK J., KONDOROSI A., 1993. Pathological and molecular characterizations of alfalfa interactions with compatible and incompatible bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *Alfalfae* and *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 6, 655-664.
- FISHER R. et HAIN R., 1994. Plant disease resistance resulting from the expression of foreign phytoalexins. *Current Opinion in Biotechnology*, 5, 125-130.
- HAIN R., REIF H.J., KRAUSE E., LANGEBARTELS R., KINDL H., WORNAM B., WIESE W., SCHMELZER E., SCHREIER P.H., STOECKER R.H. et STENZEL K., 1993. Disease resistance results from

foreign phytoalexin expression in a novel plant. NATURE, 361, 153-156.

5 LANGCAKE P. et PRYCE R.J., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. Experientia, 33, 151-152.

MELCHIOR F. et KINDL M., 1991. Coordinate and elicitor dependant expression of stilben synthase and phenyl ammonia lyase genes in *Vitis* cv optima. Arch. Biochem. Biophys., 10 288, 2 ; 552-557.

MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.

15 NEGRETIU, I. et GHARTI-CHHETRI, G.B., 1991. A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Biology, BIOMETHODS ; SALUZ, H.P. et BECKER, M.M., Series Eds., BIRKHAÜSER VERLAG, 105-122.

20 PETIT A., STOUGAARD J., KUHLE A., MARCKER K.A. et TEMPE J., 1987. Transformation and regeneration of the legume : *Lotus corniculatus*. A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 207, 245-250.

25 PIETRZAK M., SHILLITO R.D., HOHN T. et POTRYKUS I., 1986. Expression in plants of two bacterial antibiotic genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucl. Acids Res. 14 (14), 5857-5869.

30 PONT V. et PEZET R., 1990. Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. J. Phytopath., 130, 1-8.

35 REAM, W., 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. Ann. Rev. Phytopath., 27, 583-618.

- SBAGHI M., 1993. Aspects physiologiques et biochimiques de l'interaction Vigne-*Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne (France).
- 5 STANFORD, J.C., 1990, Biolistic plant transformation, Physiol. Plant. 79, 206-209.
- SZABADOS L., CHARRIER B., KONDOROSI A., De BUIJN F.T. et RATET P., 1995. New promoter and enhancer testing vectors.
- 10 Molecular Breeding.
- VANCANNEYT G., SCHMIDT R., O'CONNOR-SANCHEZ A., WILLMITZER L. et ROCHA-SOZA M., 1990. Construction of an intron-containing marker-gene : splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated transformation. Mol. Gen. Genet. 220, 245-250.
- 15 VAN LOON L.C., 1985. Pathogenesis Related Proteins. Plant Mol. Biol. 4, 111-116.
- VAN LOON L.C., PIERPOINT W.S., BOLLER T., CONEJERO V., 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis related proteins. Plant Mol. Biol. Rep 12, 245-264.
- 20 WIESE W., VORNAM B., KRAUSE E. et KINDL H., 1994. Structural organization and differential expression of three stilbene genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. Plant Mol. Biol., 26, 2, 667-677.
- 25
- 30

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique comprenant la séquence du promoteur d'une PR protéine de luzerne associée à au moins 5 une séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase.

2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur d'une PR protéine de la luzerne est un promoteur inductible dans les plantes, 10 tissus spécifiques ou non, par un stress biotique ou abiotique.

3. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une 15 PR protéine de la luzerne est choisie dans le groupe comprenant :

- a) la séquence IND S1,
- b) toute séquence correspondant à un fragment de la séquence IND S1 et ayant effet de séquence promotrice chez 20 les plantes.

4. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne présente au moins 80 % d'homologie 25 avec la séquence IND S1.

5. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne présente au moins 90 % d'homologie 30 avec la séquence IND S1.

6. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence du promoteur d'une PR protéine de la luzerne présente au moins 95 % d'homologie 35 avec la séquence IND S1.

7. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence du gène codant pour une stilbène synthase est choisie parmi les gènes isolés à partir des génomes de l'arachide, de l'orchidée, de la vigne et du pin.

8. Acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce que la séquence du gène codant pour une stilbène synthase est la séquence d'un gène codant pour une stilbène synthase de vigne.

9. Acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séquence du gène codant pour une stilbène synthase de vigne est une séquence choisie parmi :
15 a) le gène *vst1*,
 b) le gène *vst2*.

10. Système d'expression d'un gène de stilbène synthase chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Système d'expression d'un gène de stilbène synthase chez les plantes selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur.

12. Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide.

30 13. Système d'expression selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il peut être transféré dans des souches d'*Agrobacterium*.

35 14. Système d'expression selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisé en ce qu'il est inductible dans les plantes par un stress biotique ou abiotique.

15. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que le stress biotique est l'attaque d'un parasite.

5 16. Système d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce que le parasite est une bactérie, une levure, un champignon ou un virus.

10 17. Système d'expression selon la revendication 16, caractérisé en ce que le parasite est *Botrytis cinerea* ou *Plasmopora viticola*.

15 18. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que le stress abiotique est une blessure mécanique.

20 19. Système d'expression selon la revendication 18, caractérisé en ce que la blessure mécanique est causée par un insecte.

20 20. Système d'expression selon la revendication 18, caractérisé en ce que la blessure mécanique est causée par un phénomène physique tel que le vent ou le gel.

25 21. Cellule végétale transformée par un système ou un vecteur selon l'une des revendications 10 à 20.

22. Cellule selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit de cellule de vigne.

30 35 23. Procédé d'obtention de cellule selon l'une des revendications 21 et 22, caractérisé en ce qu'on transforme une cellule végétale à l'aide d'un procédé microbiologique incluant un système ou vecteur selon l'une des revendications 10 à 20.

24. Procédé d'obtention de plantes exprimant un gène de stilbène synthase, caractérisé en ce qu'on transforme des cellules végétales desdites plantes à l'aide d'un système ou d'un vecteur selon l'une des revendications 10 à 5 20, on sélectionne les cellules exprimant ledit gène et l'on régénère une plante à partir de ces cellules.

25. Plante comportant un système d'expression selon l'une des revendications 10 à 20.

10

26. Plante comportant des cellules selon l'une des revendications 21 et 22.

15

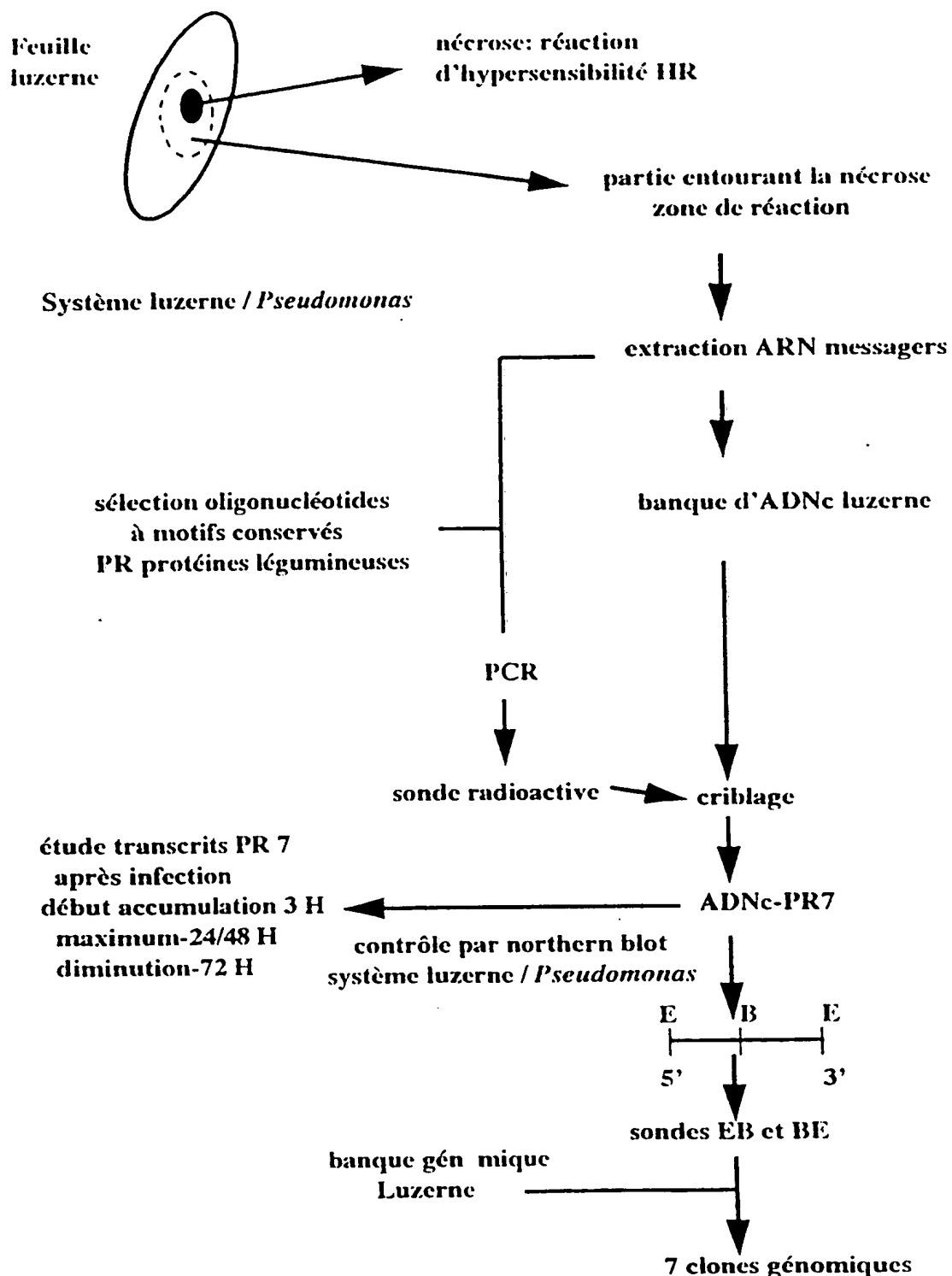
27. Plante obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 23 et 24.

28. Plante selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une plante d'intérêt agronomique.

20

29. Plante selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit de la vigne.

FIGURE 1: schéma d'isolement du promoteur
PMs PR 10-1



**FIGURE 1 bis : schéma isolement promoteur
PMs PR10-1 (suite)**

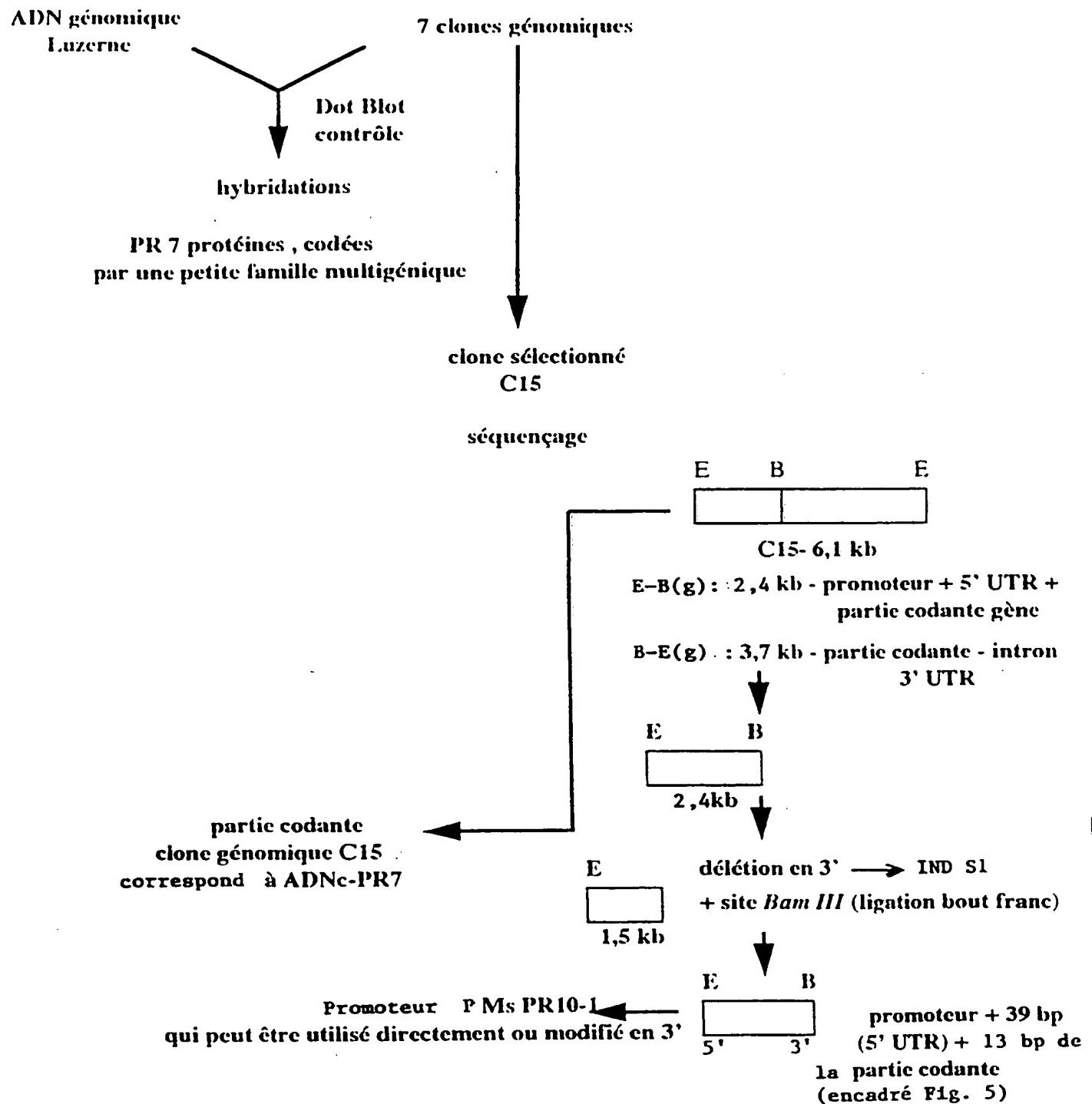


FIGURE 2

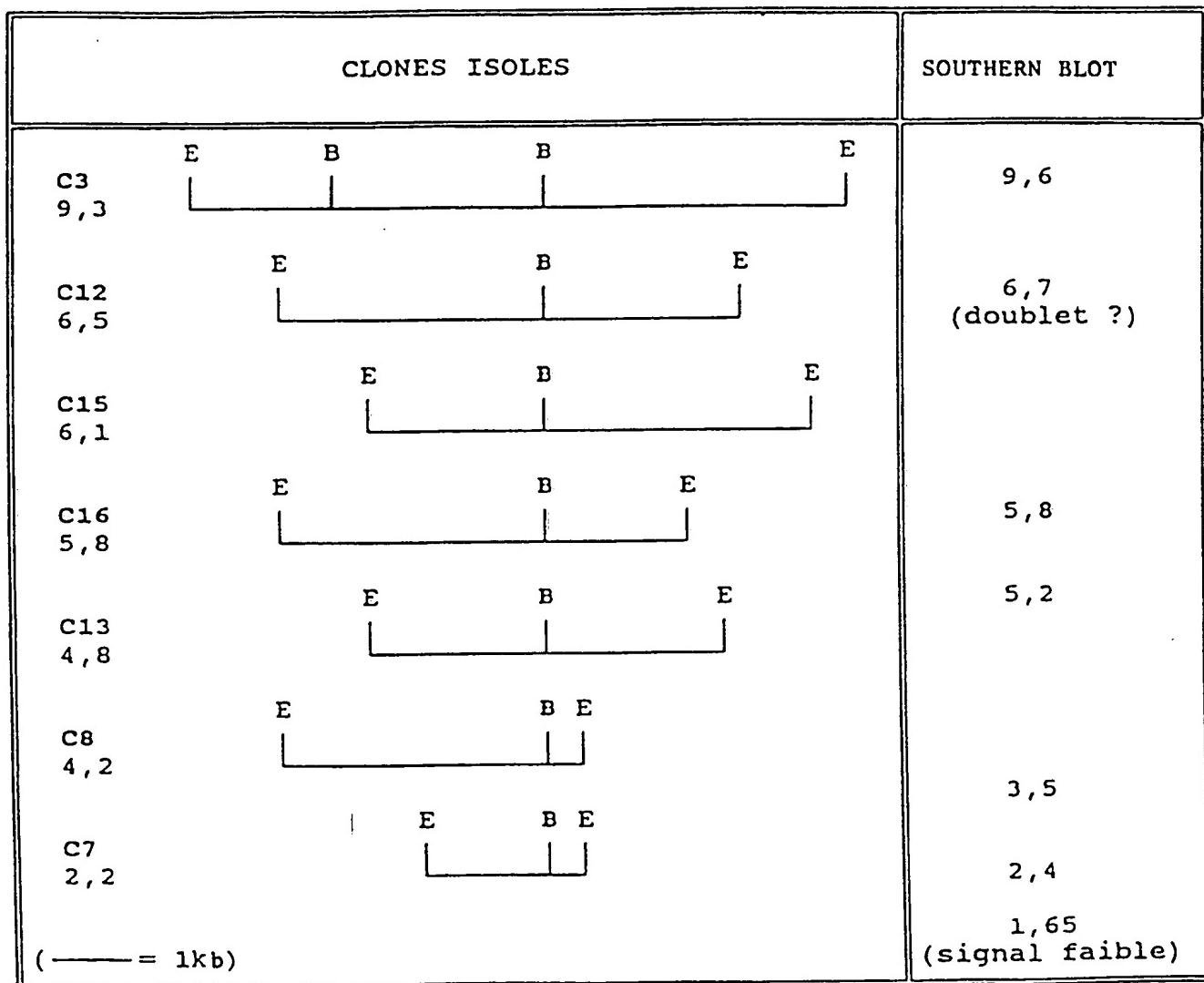


FIGURE 3

gaattttcaaaaaaaaaagttgcgccttgagaaactaataaagtttaataactaagaccctctaa
aaaaaaaaagtttaataaactaatatgaatattctctaaacaaaaataaaaactaagaagaatat
attttgttatttaccagaaaaatactttgcttagtcaaaaagaagaatatgtgaatta
atttgatactgatgattttaaagctgttagatattacgtatttagttaaaaataacaatt
attatataatttaattggtgttattcaagtgtttaacttaagttgaggittattctttagt
ttactaagttggagtgggagaagaagactattgcttggggaggaggaacgcccagtagaatgt
gttatttatattttatttttgtaggagtagagtggttatgttgaataatttttt
ttgttaggataatgtatttagacaaataatttggaaacacgaccctgtcaaagagtacacgg
aaagggggtggatataaaaagagtgcgtcgcttattcttcaggtcatttggttgtacag
tttaggaaatttgggaggaaagaaataacagactgtataacgtcaaaagaatgtctcggttatt
caggtggtagataagatatt
tccattcaatttaccatgggtggcgcttagtccgtttaccataactggacataggctaagat
ttttctttctcgttttccattacaagttctttatgttaataactgtttgactttgggttt
cttccttagtacacctgtgcttagaaggactatttggatttggtaatataatttcatattta
acctttaaaaaaaaatcaggaaaagaaaaagataaaggcgaaagtgttacctgattataa
aataaatgattaaattgaaaataaagataaataactaaaatgtttctataattaagttaa
agatggaaatatgtatatttccaaatttatattatgtaaagtttttttttttatatacgt
tgtttgtttgaaatttgagtggtcttggaggagagaaaaacaaaagagaaaaagaaaaatt
aatagtagatgcaataatttggtagtccaataataatataatgttttttttttttttt
catccaaactcatacataaaaatatttcaaaatttatgtcacgtcacaatgagaaaaat
ggcccaacgacccctgttattacacatcatcgcatcatctaaagtctaaacaatacatct
tctttcctataataacaagactcaactccactcataatcacacaggcaaacaatataactt
cttaatagttgttatttcacacattag

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 5 (suite 1)

CAAAATTGAGtggaaaacggtaagagaaaatgatataggggacatgtcttattgtattatca
gaggaggtgctacgaaagatatgtacatgttatctcaaagttaataatttagtactcctaa
atcttttattccatatcctaacaatgtgaggattgtatatttagtgattgttggagggtgcag
tcacgtcaggcaagtggatgaaactgcaagtgcgttcatctgttatcggggatcatc
catcacactggcgccgctcgagcatgcat

FIGURE 6

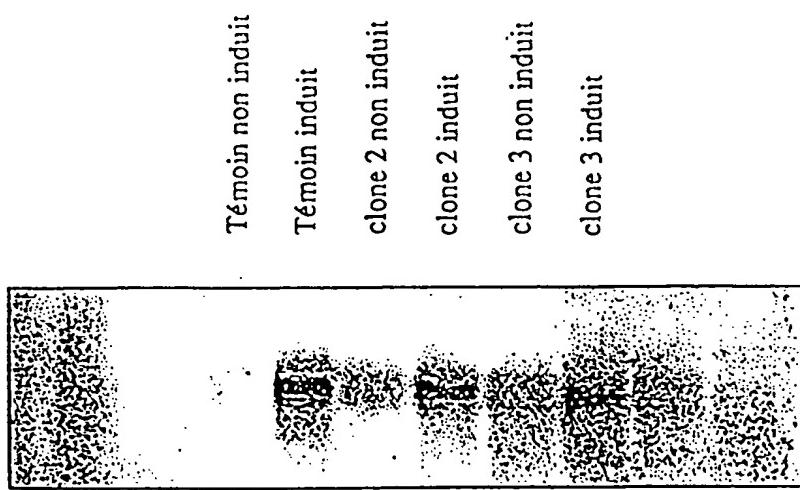


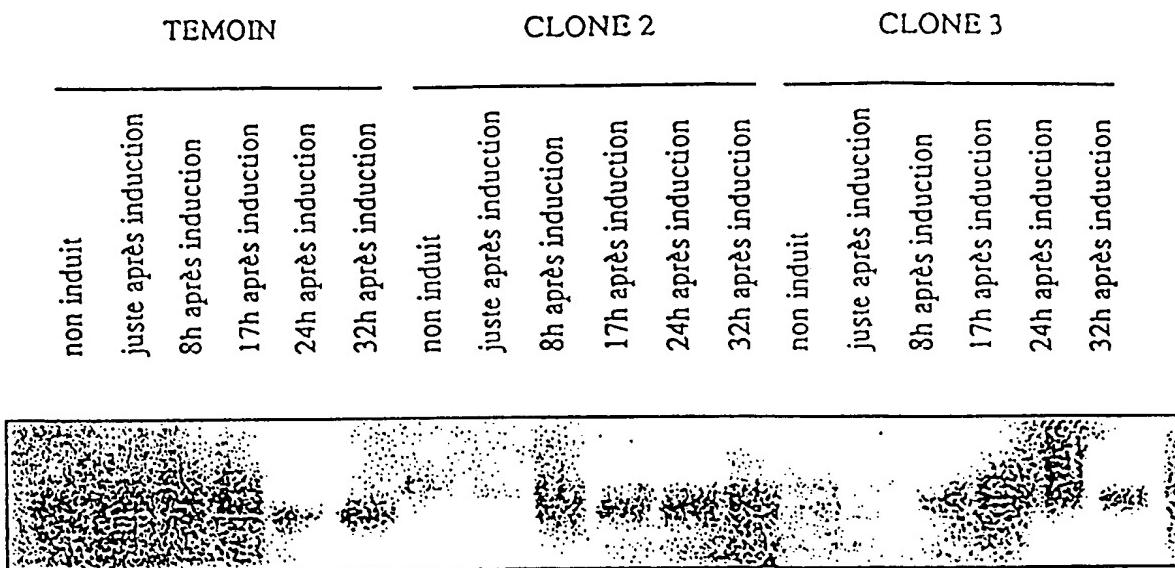
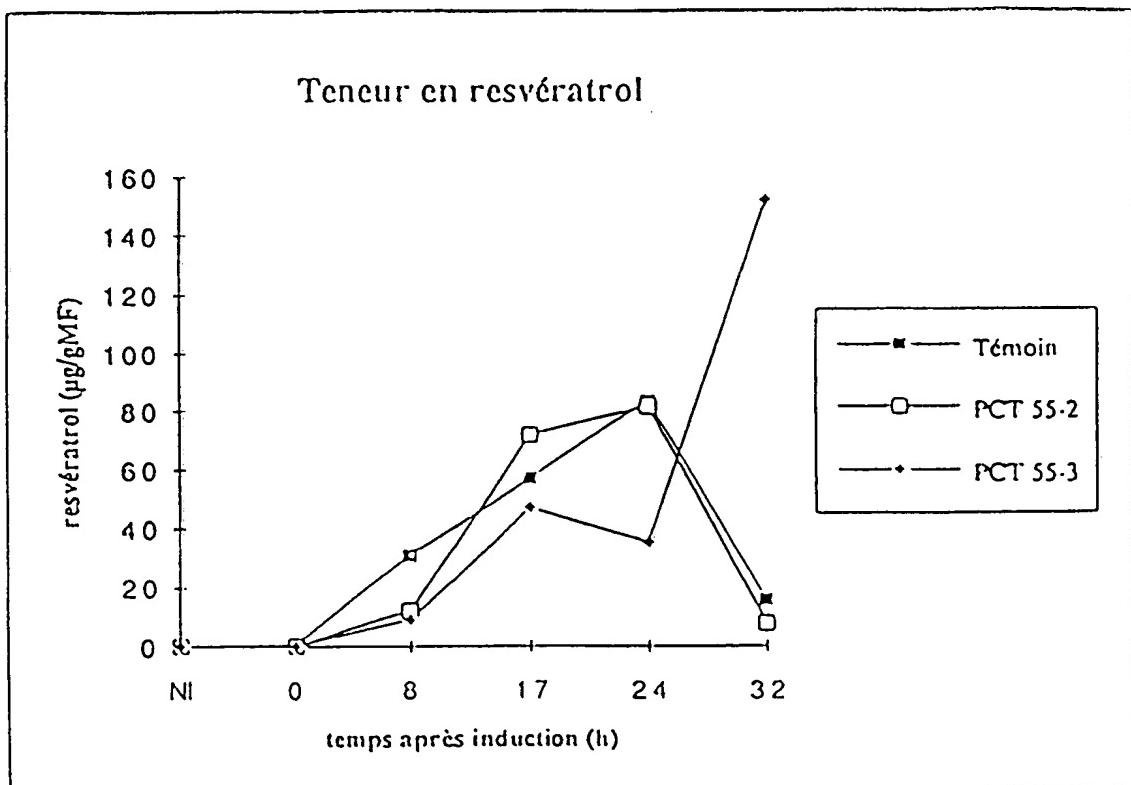
FIGURE 7

FIGURE 8



11/14

FIGURE 9

Inhibition de croissance du mycélium de *Botrytis cinerea* 916 t, après 7 jours à 20°C

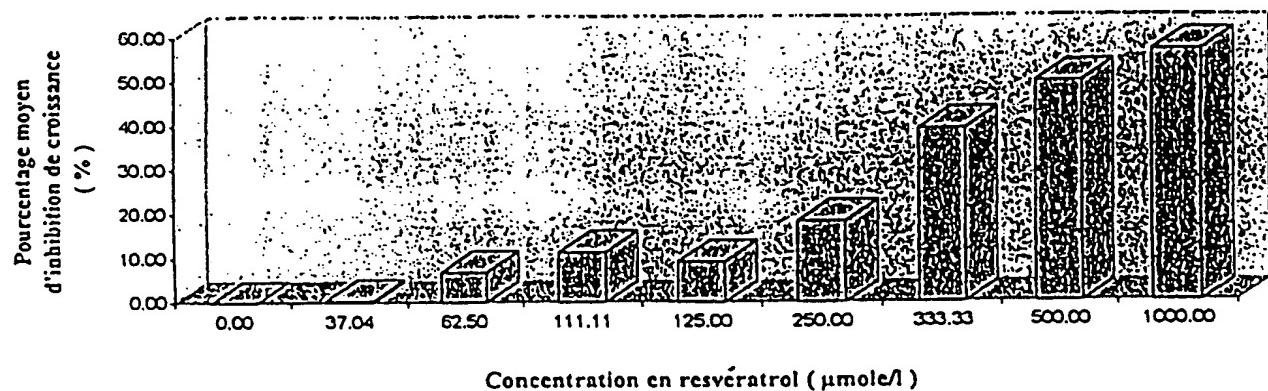


FIGURE 10 : Planche Photo 1

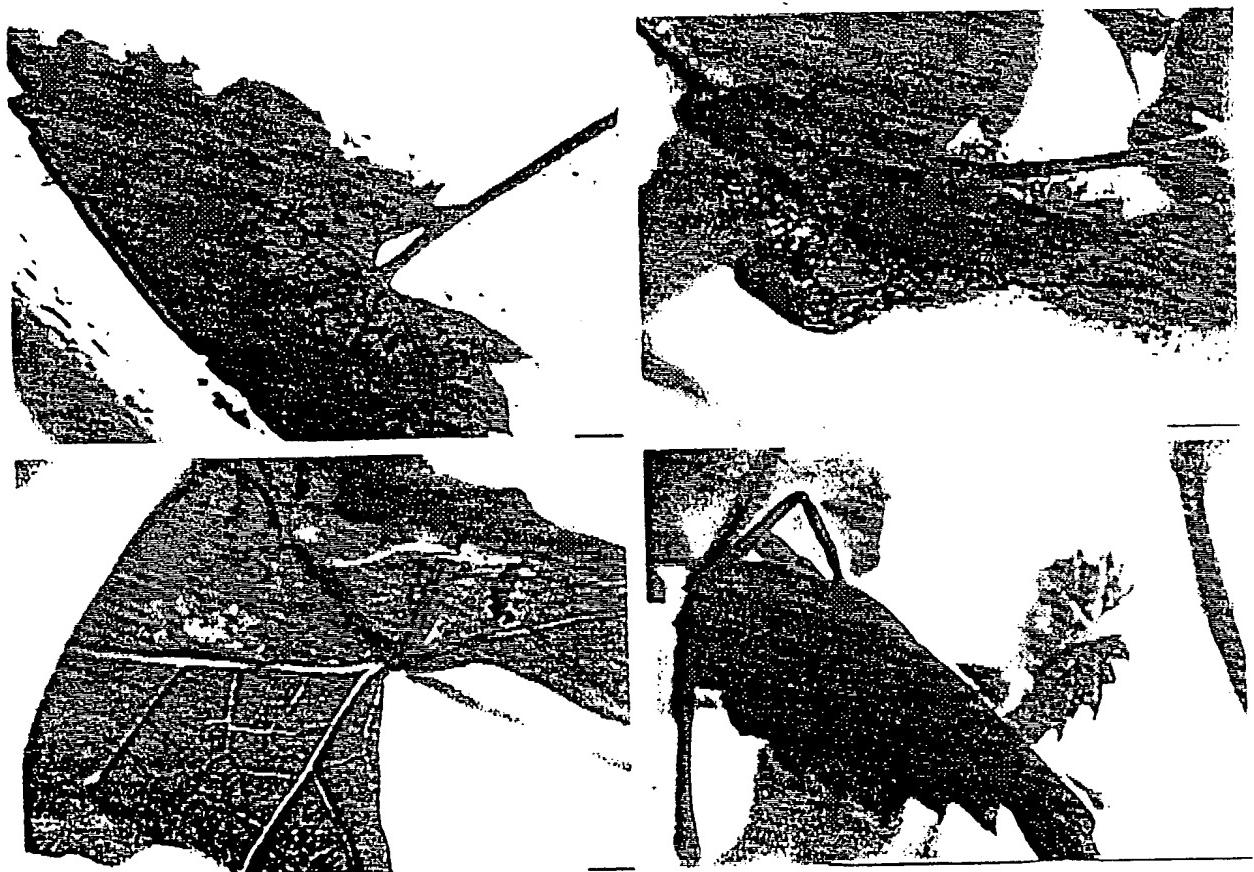


FIGURE 11 : Planche Photo 2

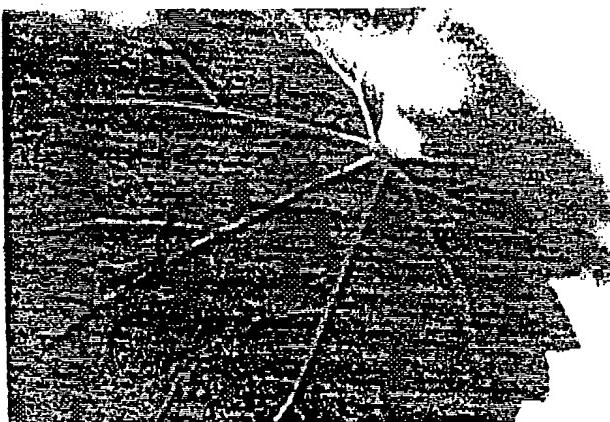
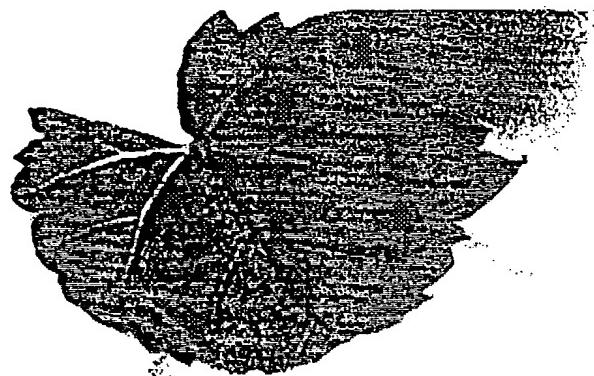
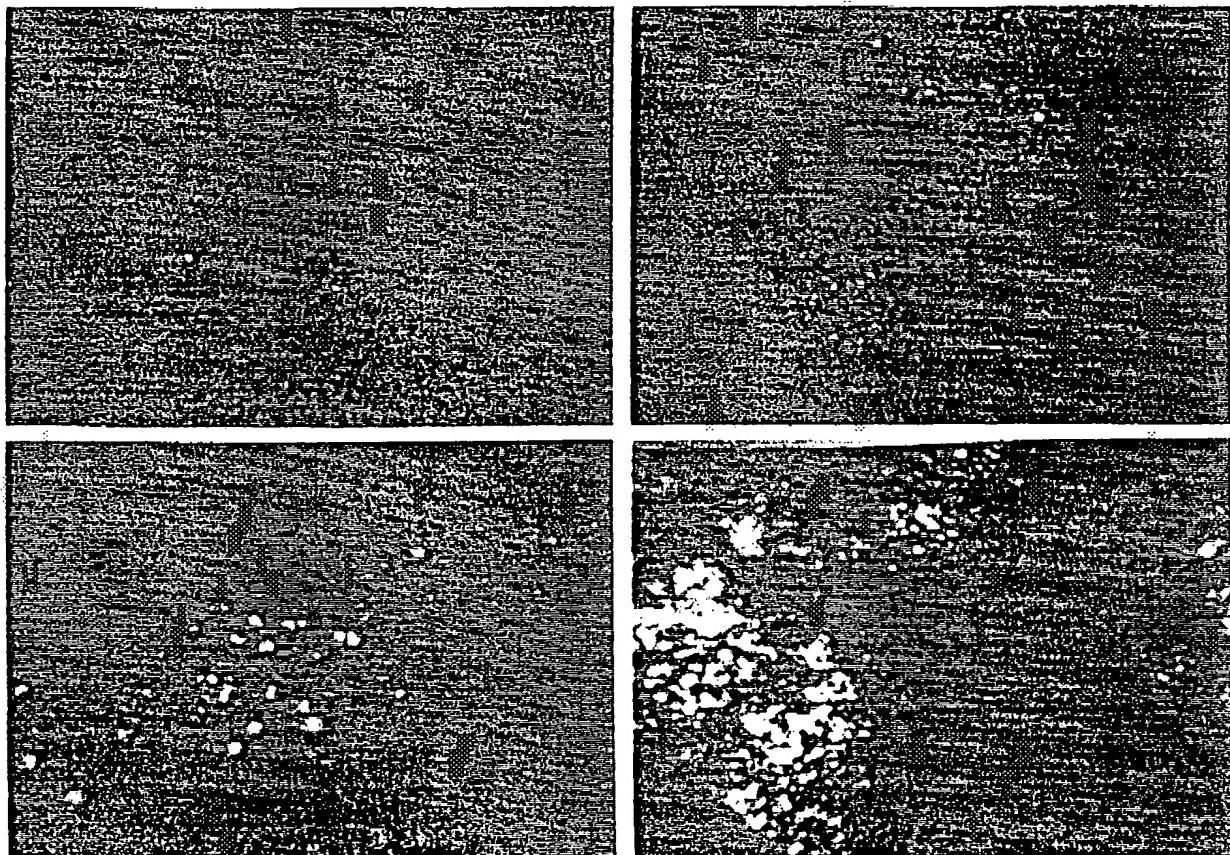


FIGURE 12 : Planche Photo 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BREDA, COLETTE ET AL: "Defense reaction in <i>Medicago sativa</i> : a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles" MOL. PLANT-MICROBE INTERACT. (1996), 9(8), 713-719, XP002081880 the whole document ---	1-29
A	US 5 677 175 A (MCGEE J DAVID ET AL) 14 October 1997 (1997-10-14) the whole document ---	1-29
A	US 5 312 912 A (HADWIGER LEE A ET AL) 17 May 1994 (1994-05-17) the whole document ---	1-29

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

13 July 1999

20/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00316

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FISCHER R: "OPTIMIERUNG DES HETEROLOGEN EXPRESSION VON STILBENSYNTHASEGENE FUER DEN PFLANZENSCHUTZ, PASSAGE" DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITAET HOHENHEIM, December 1994 (1994-12), pages 1-158, XP002081885 the whole document ---	1-29
A	HAIN R ET AL: "DISEASE RESISTANCE RESULTS FROM FOREIGN PHYTOALEXIN EXPRESSION IN ANOVEL PLANT" NATURE, vol. 361, 14 January 1993 (1993-01-14), pages 153-156, XP002026319 the whole document ---	1-29
A	EP 0 464 461 A (BAYER AG) 8 January 1992 (1992-01-08) the whole document ---	1-29
A	SPARVOLI, F., ET AL.: "V.vinifera StSy mRNA for stilbene synthase" EMBL SEQUENCE ACCESSION NO.X76892, 9 June 1994 (1994-06-09), XP002082419 the whole document ---	1-29
A	DE 44 40 200 A (BAYER AG) 15 May 1996 (1996-05-15) page 15 - page 17 ---	1-29
A	WO 93 19188 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 30 September 1993 (1993-09-30) page 10, line 37 - page 11, line 23 ---	1-29
A	TRUESDELL G M ET AL: "Isolation of pathogen-stress-inducible cDNAs from alfalfa by mRNA differential display." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 33 (4). 1997. 737-743. ISSN: 0167-4412, XP002081882 the whole document ---	1-29
A	CONSTABEL,C.P., ET AL.: "Stigma- and vascular-specific expression of the PR-10a gene of potato: A novel pattern ofexpression of a pathogenesis-related gene" MOLECULAR AND PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 8, 1995, pages 104-113, XP002081881 ---	1-29
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00316

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Pisum sativum disease resistance response protein PR10 (DRR49a)" EMBL SEQUENCE ACCESSION NO. U31669, 31 August 1995 (1995-08-31), XP002081883 the whole document -& CULLEY, ET AL.: "Plant gene register PGR95-070. Cloning and sequencing of disease-resistance response gene DRR49a (Ypr10.PS1; pi49) from Pisum sativum (accession no. U31669)" PLANT PHYSIOLOGY., vol. 109, 1995, page 722 XP002081884 ---	1-29
A	WO 94 21793 A (ELF AQUITAINE ;MARCO YVES (FR); ROBY DOMINIQUE (FR); SANOFI ELF (F) 29 September 1994 (1994-09-29) the whole document ---	1-29
A	WO 94 02619 A (PIONEER HI BRED INT) 3 February 1994 (1994-02-03) the whole document ---	1-29
A	WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 February 1995 (1995-02-09) the whole document ---	1-29
A	EP 0 307 841 A (GEN HOSPITAL CORP) 22 March 1989 (1989-03-22) the whole document ---	1-29
A	WO 95 33818 A (LIGON JAMES MADISON ;CIBA GEIGY AG (CH); SCHUPP THOMAS (CH); BECK) 14 December 1995 (1995-12-14) page 90, last paragraph - page 91, paragraph 3 ---	1-29
A	EP 0 332 104 A (CIBA GEIGY AG) 13 September 1989 (1989-09-13) the whole document ---	1-29
A	WO 97 49277 A (US GOVERNMENT ;UNIV FLORIDA RES FOUND (US)) 31 December 1997 (1997-12-31) the whole document -----	22,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00316

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5677175	A	14-10-1997	AU	7662896 A	30-04-1997
			CA	2234557 A	17-04-1997
			EP	0876094 A	11-11-1998
			WO	9713401 A	17-04-1997
US 5312912	A	17-05-1994	NONE		
EP 0464461	A	08-01-1992	DE	4107396 A	02-01-1992
			JP	6319568 A	22-11-1994
			US	5500367 A	19-03-1996
			US	5689047 A	18-11-1997
			US	5834268 A	10-11-1998
DE 4440200	A	15-05-1996	AU	700022 B	17-12-1998
			AU	3979395 A	06-06-1996
			BR	9509641 A	16-09-1997
			WO	9615251 A	23-05-1996
			EP	0787196 A	06-08-1997
			HU	77108 A	02-03-1998
			JP	10508495 T	25-08-1998
			NZ	296081 A	28-07-1998
WO 9319188	A	30-09-1993	AU	676471 B	13-03-1997
			AU	3751393 A	21-10-1993
			CA	2132323 A	30-09-1993
			EP	0631629 A	04-01-1995
			JP	7506485 T	20-07-1995
			US	5859332 A	12-01-1999
			US	5723760 A	03-03-1998
			US	5750874 A	12-05-1998
WO 9421793	A	29-09-1994	FR	2703054 A	30-09-1994
			AU	6378994 A	11-10-1994
			CA	2158960 A	29-09-1994
			EP	0689595 A	03-01-1996
			US	5792932 A	11-08-1998
WO 9402619	A	03-02-1994	US	5401836 A	28-03-1995
			AT	166108 T	15-05-1998
			AU	672618 B	10-10-1996
			AU	4673893 A	14-02-1994
			BR	9306737 A	08-12-1998
			CA	2140014 A	03-02-1994
			DE	69318558 D	18-06-1998
			DE	69318558 T	10-09-1998
			EP	0651813 A	10-05-1995
			JP	8501923 T	05-03-1996
			MX	9304285 A	29-07-1994
			NZ	254577 A	25-06-1996
WO 9503690	A	09-02-1995	AU	7518994 A	28-02-1995
			CA	2168430 A	09-02-1995
			EP	0712273 A	22-05-1996
			JP	9503652 T	15-04-1997
			SG	46678 A	20-02-1998
			US	5670349 A	23-09-1997
			US	5689056 A	18-11-1997
			ZA	9405745 A	14-03-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00316

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0307841	A	22-03-1989	AU 2487788	A	17-04-1989
			WO 8902437	A	23-03-1989

WO 9533818	A	14-12-1995	US 5639949	A	17-06-1997
			AU 695364	B	13-08-1998
			AU 2417895	A	04-01-1996
			BG 101107	A	28-11-1997
			BR 9507948	A	18-11-1997
			CA 2192366	A	14-12-1995
			CN 1152941	A	25-06-1997
			CZ 9603601	A	14-01-1998
			EP 0759078	A	26-02-1997
			HU 76534	A	29-09-1997
			JP 10501125	T	03-02-1998
			NZ 285166	A	27-04-1998
			PL 317998	A	12-05-1997
			SK 156996	A	06-08-1997
			US 5670350	A	23-09-1997
			US 5643774	A	01-07-1997
			US 5723759	A	03-03-1998
			US 5679560	A	21-10-1997
			US 5698425	A	16-12-1997
			US 5710031	A	20-01-1998
			US 5686282	A	11-11-1997
			US 5686283	A	11-11-1997
			US 5817502	A	06-10-1998
			US 5716849	A	10-02-1998
			ZA 9504686	A	08-12-1995

EP 0332104	A	13-09-1989	AU 3108089	A	14-09-1989
			DD 283647	A	17-10-1990
			DK 109889	A	09-09-1989
			FI 891054	A	09-09-1989
			IL 89495	A	31-08-1995
			JP 2009377	A	12-01-1990
			PL 162317	B	30-09-1993
			PT 89915	A,B	10-11-1989
			US 5614395	A	25-03-1997
			US 5654414	A	05-08-1997
			US 5689044	A	18-11-1997
			US 5650505	A	22-07-1997
			US 5804693	A	08-09-1998
			US 5789214	A	04-08-1998
			US 5777200	A	07-07-1998
			US 5880328	A	09-03-1999
			US 5856154	A	05-01-1999
			US 5767369	A	16-06-1998
			US 5847258	A	08-12-1998

WO 9749277	A	31-12-1997	AU 3403897	A	14-01-1998
			CA 2258265	A	31-12-1997
			ZA 9705681	A	31-07-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/00316

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BREDA, COLETTE ET AL: "Defense reaction in Medicago sativa: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles" MOL. PLANT-MICROBE INTERACT. (1996), 9(8), 713-719, XP002081880 le document en entier ---	1-29
A	US 5 677 175 A (MCGEE J DAVID ET AL) 14 octobre 1997 (1997-10-14). le document en entier ---	1-29
A	US 5 312 912 A (HADWIGER LEE A ET AL) 17 mai 1994 (1994-05-17) le document en entier ---	1-29

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 juillet 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/00316

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FISCHER R: "OPTIMIERUNG DES HETEROLOGEN EXPRESSION VON STILBENSYNTHASEGENE FUER DEN PFLANZENSCHUTZ, PASSAGE" DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT HOHENHEIM, décembre 1994 (1994-12), pages 1-158, XP002081885 le document en entier ---	1-29
A	HAIN R ET AL: "DISEASE RESISTANCE RESULTS FROM FOREIGN PHYTOALEXIN EXPRESSION IN ANOVEL PLANT" NATURE, vol. 361, 14 janvier 1993 (1993-01-14), pages 153-156, XP002026319 le document en entier ---	1-29
A	EP 0 464 461 A (BAYER AG) 8 janvier 1992 (1992-01-08) le document en entier ---	1-29
A	SPARVOLI, F., ET AL.: "V.vinifera StSy mRNA for stilbene synthase" EMBL SEQUENCE ACCESSION NO.X76892, 9 juin 1994 (1994-06-09), XP002082419 le document en entier ---	1-29
A	DE 44 40 200 A (BAYER AG) 15 mai 1996 (1996-05-15) page 15 - page 17 ---	1-29
A	WO 93 19188 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 30 septembre 1993 (1993-09-30) page 10, ligne 37 - page 11, ligne 23 ---	1-29
A	TRUESELL G M ET AL: "Isolation of pathogen-stress-inducible cDNAs from alfalfa by mRNA differential display." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 33 (4). 1997. 737-743. ISSN: 0167-4412, XP002081882 le document en entier ---	1-29
A	CONSTABEL,C.P., ET AL.: "Stigma- and vascular-specific expression of the PR-10a gene of potato: A novel pattern ofexpression of a pathogenesis-related gene" MOLECULAR AND PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 8, 1995, pages 104-113, XP002081881 ---	1-29
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°
PCT/FR 99/00316

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	" <i>Pisum sativum disease resistance response protein PR10 (DRR49a)"</i> EMBL SEQUENCE ACCESSION NO. U31669, 31 août 1995 (1995-08-31), XP002081883 le document en entier -& CULLEY, ET AL.: "Plant gene register PGR95-070. Cloning and sequencing of disease-resistance response gene DRR49a (Ypr10.PS1; pI49) from <i>Pisum sativum</i> (accession no. U31669)" <i>PLANT PHYSIOLOGY.</i> , vol. 109, 1995, page 722 XP002081884 ----	1-29
A	WO 94 21793 A (ELF AQUITAINE ;MARCO YVES (FR); ROBY DOMINIQUE (FR); SANOFI ELF (F) 29 septembre 1994 (1994-09-29) le document en entier ----	1-29
A	WO 94 02619 A (PIONEER HI BRED INT) 3 février 1994 (1994-02-03) le document en entier ----	1-29
A	WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 février 1995 (1995-02-09) le document en entier ----	1-29
A	EP 0 307 841 A (GEN HOSPITAL CORP) 22 mars 1989 (1989-03-22) le document en entier ----	1-29
A	WO 95 33818 A (LIGON JAMES MADISON ;CIBA GEIGY AG (CH); SCHUPP THOMAS (CH); BECK) 14 décembre 1995 (1995-12-14) page 90, dernier alinéa - page 91, alinéa 3 ----	1-29
A	EP 0 332 104 A (CIBA GEIGY AG) 13 septembre 1989 (1989-09-13) le document en entier ----	1-29
A	WO 97 49277 A (US GOVERNMENT ;UNIV FLORIDA RES FOUND (US)) 31 décembre 1997 (1997-12-31) le document en entier -----	22,29

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 99/00316

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
US 5677175 A	14-10-1997	AU 7662896 A	CA 2234557 A	EP 0876094 A	WO 9713401 A
					30-04-1997 17-04-1997 11-11-1998 17-04-1997
US 5312912 A	17-05-1994	AUCUN			
EP 0464461 A	08-01-1992	DE 4107396 A	JP 6319568 A	US 5500367 A	US 5689047 A
					19-03-1996 18-11-1997 10-11-1998
DE 4440200 A	15-05-1996	AU 700022 B	AU 3979395 A	BR 9509641 A	WO 9615251 A
					23-05-1996 02-01-1997 22-11-1994
		EP 0787196 A	HU 77108 A	JP 10508495 T	NZ 296081 A
					06-08-1997 02-03-1998 25-08-1998 28-07-1998
WO 9319188 A	30-09-1993	AU 676471 B	AU 3751393 A	CA 2132323 A	EP 0631629 A
					30-09-1993 04-01-1995
		JP 7506485 T	US 5859332 A	US 5723760 A	US 5750874 A
					12-01-1999 03-03-1998 12-05-1998
WO 9421793 A	29-09-1994	FR 2703054 A	AU 6378994 A	CA 2158960 A	EP 0689595 A
					20-07-1995 11-10-1994 29-09-1994
		US 5792932 A			03-01-1996 11-08-1998
WO 9402619 A	03-02-1994	US 5401836 A	AT 166108 T	AU 672618 B	AU 4673893 A
					10-10-1996 14-02-1994
		BR 9306737 A	CA 2140014 A	DE 69318558 D	DE 69318558 T
					08-12-1998 03-02-1994 18-06-1998
		DE 69318558 T	EP 0651813 A	JP 8501923 T	EP 0651813 A
					10-09-1998 10-05-1995
		JP 8501923 T	MX 9304285 A	MX 9304285 A	JP 8501923 T
					05-03-1996 29-07-1994
		NZ 254577 A			NZ 254577 A
					25-06-1996
WO 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A	CA 2168430 A	EP 0712273 A	JP 9503652 T
					22-05-1996 15-04-1997
		SG 46678 A	US 5670349 A	US 5689056 A	SG 46678 A
					20-02-1998 23-09-1997
		US 5670349 A	ZA 9405745 A	ZA 9405745 A	US 5689056 A
					18-11-1997 14-03-1995

RAPPORT DE REC
CHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 99/00316

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
EP 0307841	A	22-03-1989	AU 2487788 A WO 8902437 A		17-04-1989 23-03-1989
WO 9533818	A	14-12-1995	US 5639949 A AU 695364 B AU 2417895 A BG 101107 A BR 9507948 A CA 2192366 A CN 1152941 A CZ 9603601 A EP 0759078 A HU 76534 A JP 10501125 T NZ 285166 A PL 317998 A SK 156996 A US 5670350 A US 5643774 A US 5723759 A US 5679560 A US 5698425 A US 5710031 A US 5686282 A US 5686283 A US 5817502 A US 5716849 A ZA 9504686 A		17-06-1997 13-08-1998 04-01-1996 28-11-1997 18-11-1997 14-12-1995 25-06-1997 14-01-1998 26-02-1997 29-09-1997 03-02-1998 27-04-1998 12-05-1997 06-08-1997 23-09-1997 01-07-1997 03-03-1998 21-10-1997 16-12-1997 20-01-1998 11-11-1997 11-11-1997 06-10-1998 10-02-1998 08-12-1995
EP 0332104	A	13-09-1989	AU 3108089 A DD 283647 A DK 109889 A FI 891054 A IL 89495 A JP 2009377 A PL 162317 B PT 89915 A,B US 5614395 A US 5654414 A US 5689044 A US 5650505 A US 5804693 A US 5789214 A US 5777200 A US 5880328 A US 5856154 A US 5767369 A US 5847258 A		14-09-1989 17-10-1990 09-09-1989 09-09-1989 31-08-1995 12-01-1990 30-09-1993 10-11-1989 25-03-1997 05-08-1997 18-11-1997 22-07-1997 08-09-1998 04-08-1998 07-07-1998 09-03-1999 05-01-1999 16-06-1998 08-12-1998
WO 9749277	A	31-12-1997	AU 3403897 A CA 2258265 A ZA 9705681 A		14-01-1998 31-12-1997 31-07-1998